

09/980420
PCT/JP00/03955

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

16.06.00

REC'D 04 AUG 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月22日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第175646号

出願人
Applicant(s):

株式会社ディナバック研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2000-3057419

【書類名】 特許願

【整理番号】 D3-008

【提出日】 平成11年 6月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社デ
 ィナベック研究所内

 【氏名】 中島 俊洋

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社デ
 ィナベック研究所内

 【氏名】 中丸 健治

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社デ
 ィナベック研究所内

 【氏名】 長谷川 護

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条明田町 1 3 - 2 新烏丸日光ハ
 イツ 7 1 0 号

 【氏名】 速水 正憲

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府宇治市宇治野神 1 - 3 2

 【氏名】 井戸 栄治

【特許出願人】

 【識別番号】 595155107

 【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】

 【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 2つの外来遺伝子を発現させるためのベクター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2つの外来遺伝子を発現させるための下記（a）から（f）

；

- （a）発現制御配列、
- （b）スプライシング供与配列、
- （c）第一の外来遺伝子挿入部位、
- （d）RREコア配列、
- （e）スプライシング受容配列、
- （f）第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターDNA。

【請求項 2】 2つの外来遺伝子を発現させるための下記（a）から（f）

；

- （a）発現制御配列、
- （b）スプライシング供与配列、
- （c）RREコア配列、
- （d）第一の外来遺伝子挿入部位、
- （e）スプライシング受容配列、
- （f）第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターDNA。

【請求項 3】 RREコア配列がレトロウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 4】 RREコア配列がレンチウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 5】 RREコア配列が免疫不全ウイルス由来である、請求項 1 または 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 6】 発現制御配列がLTRである、請求項 1 から 5 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 7】 発現制御配列がLTR以外の発現制御配列を含む配列である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 8】 LTR以外の発現制御配列が、CMVLプロモーター、CMVプロモーター、およびEF1 α プロモーターからなる群より選択される、請求項 7 に記載のベクターDNA。

【請求項 9】 スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレトロウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 0】 スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレンチウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 1】 スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列が免疫不全ウイルス由来である、請求項 1 から 8 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 2】 ベクターDNA上の転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含む、請求項 1 から 1 1 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 3】 パッケージングシグナルがレトロウイルス由来である、請求項 1 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 1 4】 パッケージングシグナルがレンチウイルス由来である、請求項 1 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 1 5】 パッケージングシグナルが免疫不全ウイルス由来である、請求項 1 2 に記載のベクターDNA。

【請求項 1 6】 完全なgagタンパク質が発現しないように構築されている請求項 1 3 から 1 5 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 7】 gagタンパク質の翻訳開始コドンに変異を有する、請求項 1 3 から 1 6 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 8】 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された、請求項 1 から 1 7 のいずれかに記載のベクターDNA。

【請求項 1 9】 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項 1 2 から 1 7 のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むレトロウイルスベクター。

【請求項 20】 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項 12 から 17 のいずれかに記載のベクター DNA からの転写産物をウイルス粒子内部に含むレンチウイルスベクター。

【請求項 21】 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項 12 から 17 のいずれかに記載のベクター DNA からの転写産物をウイルス粒子内部に含む免疫不全ウイルスベクター。

【請求項 22】 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された請求項 12 から 17 のいずれかに記載のベクター DNA をパッケージング細胞に導入し、該細胞の培養上清から生産させたウイルス粒子を回収する工程を含む、ウイルスベクターの調製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、外来遺伝子を発現させるためのベクターに関する。

【0002】

【従来の技術】

研究目的や遺伝子治療などにおいて外来遺伝子を標的細胞で発現させるために、遺伝子導入用ベクターが用いられている。このような場合に、2つの遺伝子を同じ標的細胞内で発現させることが望まれることがある。このようなことが可能になれば、例えば、治療用遺伝子と共に、選択用の遺伝子を発現させることで、治療用遺伝子を導入した標的細胞を選択的に増殖させたり死滅させたりすることができる。また、治療用遺伝子と共にマーカー遺伝子（例えば GFP など）を発現させることで、治療用遺伝子導入細胞の体内での動態をモニターすることが可能となる。さらに、レセプターや転写因子など、2種のサブユニットが複合体を形成して機能を持つタンパク質を発現させることも可能となる。

【0003】

従来、2つの遺伝子を発現させるためのベクター系としては、複数のプロモーターを組み込んだ形のものと、1つのプロモーターと IRES 配列 (Internal Ribosomal Entry Site) を組み合わせた形のものが報告されている。しかしながら、こ

これらのベクターの発現特性は決して満足できるものではない。

例えば、複数のプロモーターを持つベクターは、プロモーター間の干渉により、どちらか一方のプロモーターからの発現しか効率良く起きないなどの問題点がある。また、1つのプロモーターとIRESを組み合わせたベクターは、IRESの3'側の遺伝子が、5'側の遺伝子の1/5~1/10しか発現されないという問題がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、2つの外来遺伝子を同時に発現することができるベクターを提供することを課題とする。より詳しくは、RRE配列の利用により2つの外来遺伝子を発現することができ、その改変により該2つの外来遺伝子の発現の量比を調整することが可能なベクターを提供することを課題とする。

該ウイルスベクターの好ましい態様として、ウイルス由来の発現制御配列が他の発現制御配列に改変され、該ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されているウイルスベクターを提供する。他の好ましい態様として、パッケージングシグナルを有するが、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険が減少するように改変され、さらにウイルス構造タンパク質が発現しないように改変されたウイルスベクターを提供する。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、遺伝子治療の分野において、従来から用いられてきたヒト免疫不全ウイルス（HIV）と比較して、安全性が高いなど様々な利点を有するサル免疫不全ウイルス（SIV）において、RREを利用した新規ウイルスベクターの構築を行った。

【0006】

具体的には、まず、非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンであるSIVagmTY01を基本とし、5'LTR領域、RRE、CMVプロモーター、EGFP遺伝子（またはベータガラクトシダーゼ遺伝子）、3'LTRを順に有するベクターをジェントランスファーベクターとして構築した。

【0007】

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、パッケージング細胞においてジーントランスファーベクターにトランスに作用するウイルス構造タンパク質が必要であるため、本発明者等は、次に、パッケージング細胞内においてウイルス構造タンパク質を供給するためのパッケージングベクターも構築した。即ち、パッケージング細胞内において、ウイルス外皮タンパク質（VSV-G）を発現させるためのベクターとウイルスコアタンパク質（gag）および逆転写酵素（pol）を発現させるためのベクターを構築した。

【0008】

レンチウイルスの5'LTRの転写活性は一般にウイルス由来の因子であるTatタンパク質の存在に依存している。そこで、本発明者等は、次に、構築したジーントランスファーベクターのTatタンパク質に対する依存性を解消するため、およびより転写活性の強いプロモーター配列に置換することでベクター力価を高めるために、5'LTRのプロモーター配列であるU3領域を他のプロモーター配列に置換したジーントランスファーベクターを作製した。これによりTat非依存性のベクターを提供した。

【0009】

レンチウイルスベクターにおいては、3'LTR 領域に含まれるプロモーター配列であるU3領域が、標的細胞中で逆転写される時に 5'LTR の U3プロモーター領域へ組み込まれるため、標的細胞のゲノム内では、ジーントランスファーベクタープラスミドの3'LTR領域に含まれるU3領域が、遺伝子発現に関与する5'LTRのU3プロモーターとなることが明らかとなっている。そこで標的細胞中で遺伝子発現に関与するプロモーターをU3配列以外のプロモーターに置換しうるかを検討するため、ジーントランスファーベクターの 3'LTR のU3領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターを作成した。また、同時に標的細胞中で 5'LTR に存在するプロモーター配列を欠失させうるかを検討するため、ジーントランスファーベクターの 3'LTR のU3領域を欠失させたベクターも作成した。

【0010】

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、ジーントランスファーベクター上に存在してシスに作用する因子であるパッケージン

グシグナルが必要であり、ベクターのパッケージングの効率を向上させることでベクター力価が高まることが予想される。このため、パッケージングシグナル配列により形成される構造を保持できるようにパッケージングシグナルを含む領域を可能な限り長くベクターへ組み込む必要があるが、その一方、ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの配列の重複を最小限にすることで、両者の間でおこると考えられる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を最小限に抑制する必要がある。このため、ベクター系を構築するためには、ジーントランスファーベクターを効率的にパッケージングするために必要な最小限のパッケージングシグナル配列を正確に同定することが必要である。そこで、本発明者等は、5' LTR の下流の異なる長さの領域を含むDNA断片をジーントランスファーベクターへ組み込んだ。これにより安全性およびパッケージング能をともに有するベクターを提供した。

【0011】

次に、本発明者等は、2つの外来遺伝子を同時に発現することができるウイルスベクターの構築を行なった。Rev responsive element (RRE) はウイルス由来のRevタンパク質の結合部位であり、RNAの核から細胞質への輸送に関与している。このRRE/Revのシステムを利用して、スプライシングの効率を制御することで単一のプロモーターから同時に異なる2種のタンパク質を発現する系を構築することが可能であるかの検討を行なった。

【0012】

まず、異なる2種のタンパク質の発現をRREにより制御できるかを検討するため、RREの上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子とベータガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、さらにルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE配列の下流にスプライシングアクセプター配列をそれぞれ組み込んだベクターを構築した。このベクターからはスプライシングを受けたmRNAよりベータガラクトシダーゼタンパク質が、スプライシングを受けないmRNAよりルシフェラーゼタンパク質が発現されと考えられる。

【0013】

また、単純に異なる2種の遺伝子が発現するだけでなく、その量比をRREの配列

を変えることで制御することが可能であることを検討するため、6種のRRE配列を組み込んだベクターを構築し、それぞれのベクターにおけるレポーター遺伝子の発現量を検討した。

【0014】

その結果、RRE配列を有するベクターより異なる2種の遺伝子が発現されうること、RRE配列の置換により2種の遺伝子の発現効率を制御しうることが明らかとなった。また、パッケージングベクター非存在下においても異なる2種の遺伝子が発現されることから、本遺伝子発現系はRevタンパク質の存在に非依存的に2種の遺伝子を発現させうることが明らかとなった。

【0015】

従来、RREはRevタンパクに依存的に作用すると考えられており、また、Rev/RREによる制御は、「全か無か」的なもので、Rev-ではすべてがスプライシングされた形となり、Rev+ではスプライシングされない形でとなると考えられていた。即ち、RRE配列を変えてスプライシングの割合を変えるという例はなかった。従って、上記結果によりRRE配列の改変によってスプライシングの割合を変えることができることが初めて証明された。

【0016】

さらに、本発明者等は、RREを使用した2種遺伝子の同時発現系が、5' LTR 以外の種々のプロモーターを使用した発現系に対しても適用しうるかの検討を行なった。プロモーターとしては、他のヒトサイトメガロウイルス (CMV) 由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター (EF1 α プロモーター) を使用した。その結果、5' LTR 以外のプロモーターを使用した場合においても、2種の遺伝子が同時に発現されうることが明らかとなった。また、RRE配列に依存した2種遺伝子の発現量制御も認められることが明らかとなった。これにより、RREによる2種遺伝子の同時発現系は種々のプロモーターを用いた発現系において幅広く使用されうることが明らかとなった。

【0017】

また、レポーター遺伝子がRREの上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりそれぞれの遺伝子の発現量がどの程度異なるかを検討した。ジーントラン

スファアベクターでルシフェラーゼとペータガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し、両ベクターにおける2種のレポーター遺伝子の発現量を比較した。その結果、RREの上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりレポーター遺伝子の発現量に差は認めらなかった。

【0 0 1 8】

本発明者等は、以上のように、RREは配列の利用により、2つの遺伝子を同時に発現することができ、また、用いるRRE配列の相違により該2つの遺伝子の発現比を調節することが可能な新規ウイルスベクターを構築することに成功し、これにより本発明を完成するに至った。

【0 0 1 9】

本発明は、より詳しくは、

(1) 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ；

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (d) RREコア配列、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターDNA、

(2) 2つの外来遺伝子を発現させるための下記 (a) から (f) ；

- (a) 発現制御配列、
- (b) スプライシング供与配列、
- (c) RREコア配列、
- (d) 第一の外来遺伝子挿入部位、
- (e) スプライシング受容配列、
- (f) 第二の外来遺伝子挿入部位、

の構成要素を5'側から3'側に向けて順に含むベクターDNA、

(3) RREコア配列がレトロウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、

- (4) RREコア配列がレンチウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、
- (5) RREコア配列が免疫不全ウイルス由来である、(1) または (2) に記載のベクターDNA、
- (6) 発現制御配列がLTRである、(1) から (5) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (7) 発現制御配列がLTR以外の発現制御配列を含む配列である、(1) から (6) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (8) LTR以外の発現制御配列が、CMVLプロモーター、CMVプロモーター、およびEF1 α プロモーターからなる群より選択される、(7) に記載のベクターDNA、
- (9) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレトロウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (10) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列がレンチウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (11) スプライシング供与配列およびスプライシング受容配列が免疫不全ウイルス由来である、(1) から (8) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (12) ベクターDNA上の転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含む、(1) から (11) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (13) パッケージングシグナルがレトロウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、
- (14) パッケージングシグナルがレンチウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、
- (15) パッケージングシグナルが免疫不全ウイルス由来である、(12) に記載のベクターDNA、
- (16) 完全なgagタンパク質が発現しないように構築されている (13) から (15) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (17) gagタンパク質の翻訳開始コドンに変異を有する、(13) から (16) のいずれかに記載のベクターDNA、
- (18) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された、(1) から (

1 7) のいずれかに記載のベクターDNA、

(1 9) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(1 2) から(1 7) のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むレトロウイルスベクター、

(2 0) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(1 2) から(1 7) のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むレンチウイルスベクター、

(2 1) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(1 2) から(1 7) のいずれかに記載のベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含む免疫不全ウイルスベクター、

(2 2) 第一の外来遺伝子および第二の外来遺伝子が挿入された(1 2) から(1 7) のいずれかに記載のベクターDNAをパッケージング細胞に導入し、該細胞の培養上清から生産させたウイルス粒子を回収する工程を含む、ウイルスベクターの調製方法、に関する。

【0 0 2 0】

なお、本発明において「ウイルスベクター」とは、宿主内で外来遺伝子を発現させるための核酸分子をパッケージングしたウイルス粒子を指す。

【0 0 2 1】

【発明の実施の形態】

本発明における、2つの外来遺伝子を発現させるためのベクターDNAは、構成要素として、(a) 発現制御配列、(b) スプライシング供与配列、(c) 第一の外来遺伝子挿入部位、(d) RREコア配列、(e) スプライシング受容配列、(f) 第二の外来遺伝子挿入部位を順に含むベクターDNAである(但し、構成要素(c)と構成要素(d)は入れ替わっていても良い)。

【0 0 2 2】

このベクターDNAは、2つの外来遺伝子が挿入されると、スプライシングの有無により2つの外来遺伝子を同時に発現することができる。その原理は、下記の如くである。

2つの外来遺伝子が挿入された該ベクターDNAは、適当な宿主細胞に導入され

ると、その発現制御領域の活性化によりスプライシング供与配列、第一の外来遺伝子、RREコア配列、スプライシング受容配列、第二の外来遺伝子を順に含む転写産物が生じる。この転写産物からは、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間でスプライシングが生じなければ、第一の外来遺伝子のみを翻訳しうる mRNA が生じる。この mRNA にコードされる第 1 の外来遺伝子を翻訳したりボソームは、第一の外来遺伝子のストップコドンにより RNA から離れるために、第 2 の遺伝子の翻訳は起きないと考えられる。一方、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列の間でスプライシングが生じた場合には、第一の外来遺伝子を含む領域が欠失することにより、第二の外来遺伝子のみを翻訳しうる mRNA が生じる。従って、該ベクター DNA が導入された宿主細胞においては、このスプライシングの有無により、2 つの遺伝子産物を発現させることができる。

【 0 0 2 3 】

本発明のベクター DNA で用いられる発現制御配列の種類は、LTR に制限されない。ただし、後述のようにウイルスベクターとして使用するためには、ウイルスを標的細胞に感染後、逆転写されたウイルスゲノムが宿主の染色体に組込まれる機能を有することが必要である。LTR 以外の発現制御配列でこのような機能を保持するものとしては、例えば、実施例に示すような LTR とそれ以外のプロモーターとのキメラプロモーターが挙げられる。

【 0 0 2 4 】

本発明のベクター DNA に適用されるスプライシング供与配列およびスプライシング受容配列として、通常のスプライシング供与配列と受容配列の組み合わせを用いると、ほぼ 100% の効率でスプライシングが起きると考えられるので好ましくない。本発明においては、1 種の RNA からスプライシングの差により 2 種以上のタンパク質が発現される場合に使われている配列が適している。一般に、レトロウイルスではそのような配列が多いことが知られている (A.B. Rabson and B. J. Graves, "Synthesis and Processing of Viral RNA", in "Retroviruses", p.205-262 (1997) eds. J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。例としては、配列番号 : 76 に示す SIVagm TY01 のゲノム配列中 6964 位 ~ 8177 位までの領域が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

本発明のベクターDNAにおいて第一の外来遺伝子挿入部位は、スプライシング供与配列とスプライシング受容配列との間に位置するようにする。第一の外来遺伝子の挿入部位は、目的遺伝子の翻訳を阻害しない適当な制限酵素部位を組み込むことで構築できる。第二の外来遺伝子挿入部位は、スプライシング受容配列とポリA付加シグナルとの間に位置するように適当な制限酵素部位を組み込み作製することができる。RRE配列は、第一の外来遺伝子の発現を阻害しない限り、第一の外来遺伝子の挿入部位の5'側に配置されていても3'側に配置されていてもよい。

【 0 0 2 6 】

第一の外来遺伝子と第二の外来遺伝子の組み合わせは特に制限されない。2種の遺伝子の組み合わせについて有用と考えられる例を以下に示す。

a) 治療用遺伝子と薬剤耐性マーカー

治療用遺伝子導入細胞のみを *in vivo* で薬剤を用いて選択することで、導入細胞を増やしながらか、非導入細胞を減らしていく。

b) 治療用遺伝子と増殖因子或いはそのレセプター

治療用遺伝子導入細胞の増殖を刺激することで、導入細胞のみを選択的に増殖させ、治療効果を高める。

c) 治療用遺伝子とホーミングレセプター

治療用遺伝子導入細胞が目的の部位に特異的に集まるように、ホーミングレセプターと共発現させる。例えば、AIDS治療用遺伝子とリンパ節に対するホーミングレセプターなど。

d) 治療用遺伝子とマーカー遺伝子

治療用遺伝子導入細胞にマーカーをつけることで、導入細胞の動態、半減期を常時モニターすることが可能であると考えられる。もし、体外から検出できるタンパク質があれば、導入細胞を体外から常時モニターすることができると考えられる。

e) 2種のサブユニットから構成されるタンパク質の発現

種々にタンパク質がヘテロダイマーを形成していることが明らかとなっている

が、そのようなタンパク質を発現させることができるので、従来にくらべ治療用遺伝子の選択の幅が広がる。

f) 相互作用する2種遺伝子の発現

リガンドとレセプター、酵素とその基質、シグナル伝達分子とそのレセプターなどを発現させる。例えば、増殖因子とそのレセプターを同時発現させれば、遺伝子導入細胞の数を飛躍的に増やすことができる。

g) 相乗効果を持つ2種遺伝子の発現

種々のシグナル伝達系では、例えば、2種のリガンドによる刺激で相乗効果を示すといったように、複数のシグナル伝達系の活性化により相乗効果が認められることが多い。そのような効果を持つ2種の遺伝子の発現で、治療効果を高めることができると考えられる。

【0027】

また、本発明のベクターDNAにおいては、そのRRE配列を変えることで、転写産物のスプライシングの効率を調節することができ、これにより宿主細胞内において発現する2つの遺伝子産物の量比を調節することができる。さらには、遺伝子産物の量自体を調節することも可能である。

【0028】

例えば、図8に示すように、RRE配列としてc/SA配列やc/tr配列を用いれば第一の外来遺伝子の発現比率を高めることができ、逆に、RRE配列としてc/c配列やc/x配列を用いれば、第二の外来遺伝子の発現比率を高めることができる。また、図8に示すように、用いるRRE配列の違いにより、外来遺伝子の発現量自体を変化させることができる。外来遺伝子の発現量の調節には、様々な利点が存在する。例えば、遺伝子治療において2種の遺伝子産物を発現させる場合、両者の発現量の至適発現量が存在するが、量比を制御できることで、至適発現量に調節して治療効果を高めることができると考えられる。例えば、ヘテロダイマーでは、それぞれのサブユニットであるポリペプチドが1:1の量比で発現されれば、最も効率が良いと考えられ、また、酵素と基質であれば、酵素を少なくして基質を多くすれば効率が高まると考えられる。

【0029】

本発明のベクターの生体への導入法は、例えば以下のようにして行うことができる。

a) DNA単体での導入

筋細胞への投与は、DNA単独で可能であるので、DNAをそのままベクターとして投与できると考えられる。

b) 非ウイルス系ベクターとしての投与

リポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなど、DNAと合成したトランスフェクション用の化合物との複合体の形で投与することが可能であると考えられる。

c) ウイルスベクターとしての投与

アデノウイルスなどのDNA型ウイルスベクターへ組み込み、投与することも可能であると考えられる。

【0030】

本発明のベクターDNAを用いて、これをパッケージングしたウイルス粒子を生産するためには、本発明のベクターDNAの転写されうる領域内にパッケージングシグナルを含むことが必要である。パッケージングシグナル配列により形成される構造を保持できるようにパッケージングシグナルを含む領域は、可能な限り長く該ベクターへ組み込む必要があるが、その一方、該ベクターDNA上のパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの間で起こる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を抑制するためにはこれらベクター間の配列の重複を最小限にする必要がある。従って、本発明のベクターDNAの構築においては、パッケージング効率および安全性の両者を満足させるために、パッケージングに必要な配列を含むできる限り短い配列を用いることが好ましい。

【0031】

パッケージングシグナルとしては、パッケージングベクターが導入された細胞によりパッケージングされる限り制限はなく、パッケージングベクターの種類に合わせて、レトロウイルス由来、レンチウイルス由来、免疫不全ウイルス由来のシグナルなどが用いられる。

【0032】

例えば、実施例で用いたSIVagm由来のパッケージングベクターの場合は、HIVベクターはパッケージングされないため、用いられるシグナルの由来としてはSIVのみに制限されると考えられる。但し、HIV由来のパッケージングベクターを用いた場合、SIV由来のジーントランスファーベクターのパッケージングされるので、組換えウイルスの出現頻度を低下させるために、異なるレンチウイルス由来のジーントランスファーベクターとパッケージングベクターとを組み合わせるベクター粒子を形成させることが可能であると考えられる。この場合、霊長類のレンチウイルスの間の組み合わせ（例えば、HIVとSIV）であることが好ましい。

【0033】

本発明のベクターDNAでは、gagタンパク質が発現しないように改変されていることが好ましい。ウイルスgagタンパク質は、生体にとって異物として認識され、抗原性が現れる可能性がある。また、細胞の機能に影響を及ぼす可能性もある。従って、本発明のジーントランスファーベクターにおいては、gagタンパク質は発現しないように改変されていることが好ましい。

【0034】

gagタンパク質を発現しないようにするためには、gagの開始コドンの下流に塩基の付加や欠失等によりフレームシフトするように改変することができる。また、gagタンパク質のコード領域の一部を欠失させることが好ましい。ウイルスのパッケージングには、gagタンパク質のコード領域の5'側が必要であるとされている。従って、本発明のジーントランスファーベクターにおいては、gagタンパク質コード領域のC末側を欠失していることが好ましい。パッケージング効率に大きな影響を与えない範囲でできるだけ広いgagコード領域を欠失させることが好ましい。具体的には、gagコード領域の150bpを残し、それより3'側を欠失させることができる。また、gagタンパク質の開始コドン（ATG）をATG以外のコドンに置換することも好ましい。置換するコドンは、パッケージング効率に対する影響が少ないものが好ましい。これにより構築されたパッケージングシグナルを有する本発明のベクターDNAを、適当なパッケージング細胞に導入することにより、ウイルスベクターを生産させることができる。生産させたウイルスベクターは、パッケージング細胞の培養上清から回収することができる。

【0035】

パッケージング細胞に使われる細胞としては、一般的にウイルスを産生に使用される細胞株であれば制限はない。ヒトの遺伝子治療用に用いることを考えると、細胞の由来としてはヒトまたはサルが適当であると考えられる。パッケージング細胞として使用されうるヒト細胞株としては、例えば293細胞、293T細胞、293 EBNA細胞、SW480細胞、u87MG細胞、HOS細胞、C8166細胞、MT-4細胞、Molt-4細胞などが挙げられる。サル由来細胞株としては、例えば、COS1細胞、COS7細胞、CV-1細胞、BMT10細胞などが挙げられる。

【0036】

HIV、SIV、およびFIVなどのレンチウイルスを基に作製した本発明のベクターは非分裂細胞に遺伝子を組み込むことができるため、既存のレトロウイルスベクターの遺伝子治療の限界を超えて、有効性を高めることへ貢献することが考えられる。即ち、本発明のベクターによって、非分裂細胞に多様な治療用遺伝子を染色体にインテグレーションすることが可能となる。

【0037】

本発明により各種遺伝性疾患の遺伝子治療にも応用が可能である。対象となる疾患とその単一原因遺伝子として、ゴーシェ病においては β -セレブロシダーゼ（第20染色体）、血友病においては血液凝固第8因子（X染色体）および血液凝固第9因子（X染色体）、アデノシンデアミナーゼ欠損症においてはアデノシンデアミナーゼ、フェニルケトン尿症においてはフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（第12染色体）、Duchenne型筋ジストロフィーにおいてはジストロフィン（X染色体）、家族性高コレステロール血症においてはLDLレセプター（第19染色体）、繊維性嚢嚢病においてはCFTR遺伝子の染色体への組み込み等が考えられる。それら以外の複数の遺伝子が関与していると思われる対象疾患としては、アルツハイマー、パーキンソン病等の神経変性疾患、虚血性脳障害、痴呆、またエイズ等の難治性の感染症等が考えられる。エイズ患者の造血幹細胞を細胞外にとりだしin vitroでSIVベースの本発明のベクターを作用させて、HIVの感染が起こる前にSIVに由来するゲノム転写を優勢にして、患者の体に戻し、HIVの転写因子を無効にする治療方法が考えられる。さらには、慢性疾患への応用として、

虚血性心疾患においてはVEGFならびにFGF2遺伝子、動脈硬化の遺伝子治療に関しては、細胞増殖関連遺伝子、例えば細胞増殖因子（PDGF、TGF- β 等）、Cyclin-dependent kinase等の発現抑制への応用が可能となる。また糖尿病においてはBDNF遺伝子が候補となりうる。またこの方法により、遺伝子変異が癌化を引き起こす癌抑制遺伝子p53等の遺伝子を染色体に組み込む補充治療への応用、多剤耐性遺伝子をin vitroで骨髄由来造血幹細胞に導入した後、患者の血液に戻すことによって、癌の薬物治療の限界を超えた治療が可能となる。自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節リウマチ、SLE、糸球体腎炎等の遺伝子治療に関しては、T細胞レセプター、各種接着因子（例えばICAM-1、LFA-1、VCAM-1、LFA-4等）、サイトカインおよびサイトカインレセプター（例えばTNF、IL-8、IL-6、IL-1等）細胞増殖因子（例えばPDGF、TGF- β 等）、作用因子（例えばMMP等）のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。アレルギー性疾患の遺伝子治療に関しては、IL-4、Fc ϵ R-I等のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。臓器移植に関連する遺伝子治療に関しては、ヒト以外の動物ドナーの組織適合性抗原をヒト型に変えて異種移植の成功率を高める応用が可能となる。さらにはヒトES細胞の染色体に外来遺伝子を導入し、胚の段階で欠損する遺伝子を補って、体循環する酵素、成長因子等の不足を補充する治療が考えられる。

【0038】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 SIVagmベクターの構築と性能の確認

非病原性のサル免疫不全ウイルスクローンであるSIVagmTY01を用いて、新規レンチウイルスベクターの構築を下記のように行った。図1にベクターシステムの概要を示す。

ベクター系の構築には、非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンであるSIVagmTY01を用いた。ヌクレオチドの番号は以下すべてウイルスRNAの転写開始点を+1として表記した。SIVagmTY01を組み込んだプラスミドとし

てはpSA212 (J.Viol.,vol.64,pp307-312,1990) を用いた。また、ライゲーション反応は、すべてLigation High (東洋紡) を用い添付説明書に従って行った。

【 0 0 3 9 】

a. パッケージングベクターの構築

まず、vifとtat/revの第1エクソンを含む領域(5337-5770)に相当するDNA断片をプライマー1F (配列番号: 1) と1R (配列番号: 2) を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得た。PCRプライマーに制限酵素部位であるEcoRI部位を付加することでDNA断片の3' 端にEcoRI部位をもつ断片を調製した。PCR断片をBglIIとEcoRIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動とWizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) で精製した。以上のようにして得たDNA断片と、gag/pol領域をコードするDNA断片 (XhoI (356) 部位からBglII (5338) 部位までを含む) を、pBluescript KS+ (Stratagene) のXhoI-EcoRI部位へライゲーションした。次に、Rev responsive element (RRE) とtat/revの第2エクソンを含む領域(6964-7993)に相当するDNA断片をPCRで増幅した。上記のPCR断片と同様にプライマー2F (配列番号: 3) と2R (配列番号: 4) を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより3' 端にNotI部位を付加し、EcoRIとNotIで切断後に精製し、gag-tat/revを組み込んだpBluescript KS+のEcoRI-NotI部位へ組み込んだ。

さらに、スプライシングドナー (SD) 部位を含むDNA断片を合成した (配列3F (配列番号: 5) と3R (配列番号: 6))。合成時に5' 端にXhoI部位、3' 端にSalI部位を付加し、上記のgag-RRE-tat/revを組み込んだpBluescript KS+のXhoI部位へ組み込んだ。得られたプラスミドをXhoIとNotIにより切断し、SD~tat/revを含む断片を精製し、pCAGGS (Gene,vol.108, pp193-200, 1991) のEcoRI部位にXhoI/NotIリンカー (配列4F (配列番号: 7) と4R (配列番号: 8)) を組み込んだプラスミドのXhoI-NotI部位へ組み込んだ。以上の方法により得られたプラスミドをパッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) として使用した。

【 0 0 4 0 】

b. ジーントランスファーベクターの構築

SIVagmTY01由来の5' LTR領域 (8547-9053+1-982、 5' 端にKpnI部位、3' 端

にEcoRI部位を付加)は プライマー5-1F (配列番号: 9) と5-1R (配列番号: 10) を、RRE(7380-7993、 5' 端にEcoRI部位、3' 端にSacII部位を付加)はプライマー 5-2F (配列番号: 11) と5-2R (配列番号: 12) を、3' LTR(8521-9170、 5' 端にNotIとBamHI部位、3' 端にSacI部位を付加)はプライマー 5-3F (配列番号: 13) と5-3R (配列番号: 14) をそれぞれ用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより増幅した。pEGFPC2 (Clontech) 由来のCMVプロモーター領域とEGFPをコードする領域 (1-1330、 5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位とBamHI部位と翻訳ストップコドン(付加)をプライマー6F (配列番号: 15) と6R (配列番号: 16) を用いてpEGFPC2をテンプレートとしたPCRにより増幅した。4種のPCR断片をそれぞれ制限酵素KpnIとEcoRI、EcoRIとSacII、BamHIとSacI、SacIIとBamHI切断した後に精製し、pBluescript KS+のKpnI-SacIの間に5' LTR→3' LTR→RREとCMVプロモーターEGFPの順にライゲーションして組み込んだ (pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/WT3' LTR)。レポーター遺伝子としてβ-ガラクトシダーゼを使用する場合には、上記のようにしてPCRにより調製した5' LTR領域と3' LTR領域を含むDNA断片をそれぞれ制限酵素KpnIとEcoRI、NotIとSacIで切断した後に精製し、pBluescript KS+のKpnI-EcoRIとNotI-SacIにそれぞれ組み込んだプラスミド (pBS/5' LTR.U3G2/WT3' LTR)NotI部位にpCMV-beta(Clontech)のβ-ガラクトシダーゼをコードする領域を含むNotI断片(820-4294)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3G2/beta-gal/WT3' LTR)。次にプラスミドpBS/5' LTR.U3G2/beta-gal/WT3' LTRのEcoRI-NotI部位に、プライマー7-1F(配列番号:17)と7-1R(配列番号:18)を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより増幅したRRE配列(6964-8177、 5' 端にEcoRI部位、3' 端にNotI部位を付加)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3G2/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR)後にRRE配列をEcoRIとNheIで切り出し、プライマー7-2F(配列番号:19)と7-2R(配列番号:20)を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより増幅したRRE配列(7380-7993、 5' 端にEcoRI部位、3' 端にNheI部位を付加)を組み込んだ。以上の方法で得られたプラスミド(pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR)をNheIとSmaIで切断し平滑末端化した後、pEGFPN2(Clontech)由来のCMVプロモーター領域(8-592、AseI-NheI断片を平滑末端化)を組み込んだ(pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVF beta-gal/WT3' LTR)。平滑末端化反応はすべてBlunting High(東洋紡)を使用し

て添付説明書に従って行った。プラスミド pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT 3' LTR と pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT 3' LTR をそれぞれ KpnI-SacI で切断して 5' LTR-3' LTR を含む DNA 断片を調製し、pGL3Control (Promega) ベクターの KpnI-SacI 部位へ組み込み、ジーントランスファーベクター (pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal または EGFP/WT 3' LTR) として使用した。パッケージングシグナルの同定には、pBS/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVfbeta-gal/WT 3' LTR プラスミドの 5' LTR を KpnI と EcoRI で切り出し、種々の長さの異なる領域を含む DNA 断片をプライマー 8F (配列番号:21) と 8-1R から 12R (配列番号:22 から 33) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した 12 種の DNA 断片を、KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターを使用した。

【 0 0 4 1 】

また、gag ポリペプチドをコードする領域にフレームシフトを導入したベクターはプライマー 8F (配列番号:21) と 8-3R (配列番号:24) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターの EcoRI 部位へ 8-FSF (配列番号:34) と 8-FSR (配列番号:35) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を組み込むことで得た。gag ポリペプチドの翻訳開始コドン (ATG) に対して点突然変異を導入したベクターはプライマー 8F (配列番号:21) と 8-PMR1 から 9 (配列番号:36 から 44) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を KpnI-EcoRI 部位へ組み込んだベクターの EcoRI 部位へ 8-FSF (配列番号:34) と 8-FSR (配列番号:35) を用いて pSA212 をテンプレートとした PCR で調製した DNA 断片を組み込むことで得た。

【 0 0 4 2 】

ベクターの性能確認の一般的な方法は以下の通りである。293T 細胞を 6 ウェルのプラスチックプレート (住友ベークライト) へ 1 ウェルあたり 5×10^5 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中 (37℃、10% 炭酸ガス存在下) で 48 時間培養する。培養後に培養液を 1 ウェルあたり 800 μ l の OptiMEM に置換してトランスフェクションに使用する。DNA 量は 1 ウェルあたり 300ng のジーントランスファーベクターと 600ng のパッケージングベクターと 100ng の VSV-G 発現ベクター (pHCMV-G, Methods in Cell Biology, vol.43, pp99-112, 1994) を使用する。DNA を 100 μ l

のOptiMEMに溶解後に6 μ lのPLUS reagentを加えて攪拌後15分室温で静置する。DNAとPLUS reagentとの混合液に、100 μ lのOptiMEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINEを添加して攪拌後さらに15分室温で静置する。以上の方法により調製したDNAとLIPOFECTAMINEとの複合体を含む溶液を6ウェルプレートで培養している293T細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中(37℃10%炭酸ガス存在下)で3時間培養する。培養後1ウェルあたり1mlの20%非動化ウシ胎児血清を含むD-MEMを添加し、炭酸ガスインキュベーター中で37℃10%炭酸ガス存在下で12時間培養した後、1ウェルあたり2mlの10%非動化ウシ胎児血清を含むD-MEMに培地交換し、さらに24時間培養した後に細胞の培養上清を0.45 μ mのポアサイズのフィルター(DISMIC-25CSフィルター、ADVANTEC)で濾過してアッセイに使用する。

【0043】

濃縮ストックを調製する場合には、まず293T細胞を15センチメートルのプラスチックプレート(住友ベークライト)へ1プレートあたり 2.5×10^6 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中(37℃、10%炭酸ガス存在下)で48時間培養後に培養液を1ウェルあたり10mlのOptiMEMに置換してトランスフェクションに使用する。DNA量は1プレートあたり6 μ gのジーントランスファーベクターと3 μ gのパッケージングベクターと1 μ gのVSV-G発現ベクター(pHCMV-G)を使用する。DNAを1.5mlのOptiMEMに溶解後に40 μ lのPLUS reagentを加えて攪拌後15分室温で静置する。DNAとPLUS reagentとの混合液に、1mlのOptiMEMで希釈した60 μ lのLIPOFECTAMINEを添加して攪拌後さらに15分室温で静置する。以上の方法により調製したDNAとLIPOFECTAMINEとの複合体を含む溶液を6ウェルプレートで培養している293T細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中で37℃ 10%炭酸ガス存在下で3時間培養する。培養後1プレートあたり10mlの20%非動化ウシ胎児血清を含むD-MEMを添加し、炭酸ガスインキュベーター中で37℃ 10%炭酸ガス存在下で12時間培養した後培地を1プレートあたり20mlの10%ウシ胎児血清を含むD-MEMに交換し、さらに24時間培養した後に培養上清を0.45 μ mのポアサイズのフィルターで濾過後に、セントリプラス YM-100(Amicon)を用いて4℃、3000 gの条件で170分遠心し限外濾過を行うことで100倍に

濃縮する。濃縮後のサンプルはマイナス80℃で保存してアッセイに使用する。

【0044】

これにより調製したSIVagmウイルスベクターは、ヒト細胞株293Tなどを用いて遺伝子導入効率を決定することができる。また、後述のアフィジコリン処理（G1-S期での停止）やX線照射（G2-M期での停止）により、特定の細胞周期における遺伝子導入効率を検討することもできる。

【0045】

また、SIVagmベクターの導入実験を各種細胞を用いて試行すれば、SIVagmベクターがより生理的状态に近い細胞に対しても同様に遺伝子導入しうるかを決定することができる。そのような細胞としては、例えば、ヒト神経芽細胞株RBTM1とSH-SY5Y細胞を全トランス型レチノイン酸処理により分化誘導させたものや、ラット初代培養脳細胞（後述）などか挙げられる。

【0046】

【実施例2】 5' LTRの改変

レンチウイルスの5' LTRの転写活性は一般にウイルス由来の因子であるTatタンパク質の存在に依存している。そこで、Tatに対する依存性を解消するためと、より転写活性の強いプロモーター配列に置換することでベクター力価を高めるために、5' LTRのプロモーター配列であるU3領域を他のプロモーター配列に置換したSIVagmジントランスファーベクターを作製した（図2）。

【0047】

5' LTRのキメラプロモーターへの置換は、以下のようにして行った。5' LTRのTATAボックスの下流～gag領域（9039-9170+1-982）を含む断片をプライマー9-1Fから3F（配列番号：45から47）と9R（配列番号：48）を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅した。また、CMVLプロモーター（pCI（Promega）由来、1-721）、CMVプロモーター（pEGFPN2（Clontech）由来、1-568）、EF1アルファプロモーター（pEF-BOS（Nucleic Acids Research, vol.18, p5322, 1990）の2240-2740）、CAプロモーター（pCAGGSの5-650）を含む断片をそれぞれプライマー10-1F（配列番号：49）と10-1R（配列番号：50）、10-2F（配列番号：51）と10-2R（配列番号：52）、10-3F（配列番号：53）と10-3R（配列番号：54）、10-4F（配

列番号：55)と10-4R(配列番号：56)を用いてそれぞれpCI、pEGFPN2、pEF-BOS、pCAGGSをテンプレートとしたPCRで増幅した。増幅後に5' LTRを含む断片と上記の各プロモーターを含む断片とを混合し、それぞれのプロモーターの5'側のプライマー(10-1F(配列番号：49)、10-2F(配列番号：51)、10-3F(配列番号：53)、10-4F(配列番号：55))と、5' LTRの3'側のプライマー(9R)を添加し、更に10サイクルのPCR反応を行うことで、4種のプロモーターと5' LTRとのキメラプロモーターのDNA断片を得た。得られたDNA断片は、ジーントランスファーベクター(pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR)のKpnI-EcoRI部位に組み込んだ(pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CMV.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/EF1アルファ.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CAG.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR)。

【0048】

[実施例3] 3' LTRの改変

レンチウイルスベクターにおいては、3' LTR領域に含まれるプロモーター配列であるU3領域が、標的細胞中で逆転写される時に5' LTRのU3プロモーター領域へ組み込まれるため、標的細胞のゲノム内では、ジーントランスファーベクタープラスミドの3' LTR領域に含まれるU3領域が、遺伝子発現に関与する5' LTRのU3プロモーターとなることが明らかとなっている(図3)。そこで標的細胞中で遺伝子発現に関与するプロモーターをU3配列以外のプロモーターに置換しうるかを検討することが可能な、SIVagmジーントランスファーベクターの3' LTRのU3領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターを作成した(図3)。また、同時に標的細胞中で5' LTRに存在するプロモーター配列を欠失させうるかを検討することが可能な、SIVagmジーントランスファーベクターの3' LTRのU3領域を欠失させたベクターも作成した。

【0049】

3' LTRのU3プロモーター配列の改変と欠失は、以下のように行った。3' LTRのU3を含まないDNA断片をプライマー11F(配列番号：57)と11R(配列番号：58)を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅した。また、U3領域を他のプロモーターへ置換した3' LTRはプライマー12-1Fから3F(配列番号：59から61)と1

2R (配列番号: 62) を用いて、実施例 2 に記載の方法で得られたキメラプロモーターを組み込んだベクタープラスミドである pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/EF1アルファ.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR、pGL3C/CAG.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR をそれぞれテンプレートとして PCR で増幅した。PCR により得られた DNA 断片は SalI と SacI で切断後に精製し、pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/WT3' LTR の SalI-SacI 部位へ組み込んだ (pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/3LTRdeltaU3、pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/CMVL.R、pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/EF1アルファ.R、pGL3C/5' LTR.U3G2/RREc/s/CMVFbeta-gal/CAG.R)。

【0050】

〔実施例 4〕 パッケージングシグナルの同定

ジーントランスファーベクターのベクター粒子へのパッケージングには、ジーントランスファーベクター上に存在してシスに作用する因子であるパッケージングシグナルとパッケージングベクターより供給されトランスに作用するタンパク質が必要である。ベクターのパッケージングの効率を向上させることでベクター力価が高まることが予想されるため、パッケージングシグナルの配列により形成される構造を保持出来るようにパッケージングシグナルを含む領域を可能な限り長くベクターへ組み込む必要がある。一方、ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルとパッケージングベクターとの配列の重複を最小限にすることで、両者の間でおこると考えられる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を最小限にする事が可能となることから、パッケージングに必要な最小領域を同定することが必要である。従って、ベクター系を構築するためには、ジーントランスファーベクターを効率的にパッケージングするために必要な最小限のパッケージングシグナル配列を正確に同定することが必要である。パッケージングシグナルの同定は、図 4 に示す方法で行ないうる。

gag 領域により発現されるポリペプチドがパッケージングに必要であるのか、あるいは gag 領域の DNA 配列自身が必要であるかについては、図 5 に示すような変異を導入したジーントランスファーベクターと野生型ジーントランスファーベクターのパッケージング効率を比較することで明らかにしうる。

【0051】

【実施例5】 新規2種遺伝子の同時発現系の開発

Rev responsive element (RRE) はウイルス由来のRevタンパク質の結合部位であり、RNAの核から細胞質への輸送に関与している。このRRE/Revのシステムを利用して、スプライシングの効率を制御することで単一のプロモーターから同時に異なる2種のタンパク質を発現する系を構築することが可能であるかを検討した。

【0052】

まず、異なる2種のタンパク質の発現をRREにより制御できるかを検討するため、図6に示すベクターを構築した。すなわちRREの上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子を組み込み、更にルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE配列の下流にスプライシングアクセプター配列をそれぞれ組み込んだベクターを構築した。図6に示すようにこのベクターからはスプライシングの有無により2種のmRNAが産生される事が予想される。すなわちスプライシングを受けたmRNAより β -ガラクトシダーゼタンパク質が、スプライシングを受けないmRNAよりルシフェラーゼタンパク質が発現されると考えられる。また、単純に異なる2種の遺伝子を発現するだけでなく、その量比をRREの配列を変えることで制御することが可能であるかを検討するため、6種のRRE配列を組み込んだベクターを構築し、それぞれのベクターにおけるレポーター遺伝子の発現量を検討した。

【0053】

2遺伝子発現系を組み込んだベクターとRRE配列の活性検討用ベクターの構築は、以下のように行った。ルシフェラーゼ、あるいはEGFPをコードする遺伝子断片の5' と3' の両端にEcoRI部位を付加したDNA断片をプライマー13-1F（配列番号：63）と13-1R（配列番号：64）、13-2F（配列番号：65）と13-2R（配列番号：66）を用いpSP-luc+(Promega)とpEGFPN2(Clontech)をそれぞれテンプレートとしたPCRにより増幅した。

【0054】

プラスミドpBS/5' LTR.U3G2/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTRをKpnIとEcoRIで切断

し、プライマー14F（配列番号：67）と14R（配列番号：68）を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得た5' LTRを含むDNA断片を組み込んだ（pBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTR）。プラスミドpBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/tr/beta-gal/WT3' LTRをEcoRIとNheIで切断してRRE配列を切り出し、種々のRRE配列を含むDNA断片を3種のプライマー（15-1F（配列番号：69）と15-2F（配列番号：70））と、3種のプライマー（15-1R（配列番号：71）、15-2R（配列番号：72）、15-3R（配列番号：73））を組み合わせてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得た6種のDNA断片をEcoRIとNheI、あるいはEcoRIとXbaIで切断後に精製したDNA断片へ置換した。得られたプラスミドのEcoRI部位に、PCRにより調製したルシフェラーゼ、あるいはEGFPをコードする遺伝子断片をEcoRIで切断後に精製したものを組み込みRRE配列の活性検討用のアッセイに使用した（図7）。

【0055】

レポーター遺伝子の位置の置換は、以下のように行った。RRE6/s(6964-7993)配列を含むプラスミド pBS/5' LTR.U3Met-/RRE6/s/beta-gal/WT3' LTRをNheIとSmaIで切断し、β-ガラクトシダーゼをコードする領域を含む断片を切り出した後、ルシフェラーゼをコードする領域を含むNheI-XhoI断片（pSP-luc+由来、17-1723）を組み込んだ（pBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/luc+/WT3' LTR）。次にpBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/luc+/WT3' LTRをEcoRI切断後に平滑末端化し、pCMV-beta(Clontech)のβ-ガラクトシダーゼをコードする領域を含むNotI断片（820-4294）を平滑末端化後に精製したものを組み込み（pBS/5' LTR.U3Met-/beta-gal/RREc/s/luc+/WT3' LTR）アッセイに使用した。平滑末端化反応はともにBlunting High（東洋紡）を使用して添付説明書に従って行った。

【0056】

プラスミドpBS/5' LTR.U3Met-/RREc/s/beta-gal/WT3' LTRをKpnIとEcoRIで切断して5' LTRをプライマー16F（配列番号：74）と16R（配列番号：75）を組み合わせてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得たDNA断片を組み込んだ（pBS/5' LTR.U3G3/RREc/s/beta-gal/WT3' LTR）。

【0057】

pBS/5' LTR.U3G3/RREc/s/beta-gal/WT3' LTRのEcoRI部位に、PCRにより調製し

たEGFPをコードする遺伝子断片をEcoRIで切断後に精製したものを組んだ後に、KpnI-SacIで切断して5' LTR-3' LTRを含むDNA断片を調製し、pGL3Control(Promega)ベクターのKpnI-SacI部位へ組み込みin situでの2遺伝子発現系の検定に用いた。

【0058】

このようにして構築したジーントランスファーベクターを後述のように293T細胞にトランスフェクションし、 β -ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、図8のグラフに示すように、RRE配列を有するベクターより異なる2種の遺伝子が発現されうること、RRE配列の置換により2種の遺伝子の発現効率を制御しうることが明らかとなった。また、パッケージベクター非存在下においても異なる2種の遺伝子が発現されることから、本遺伝子発現系はRevタンパク質の存在に非依存的に2種の遺伝子を発現させうることが明らかとなった。

【0059】

〔実施例6〕 2種遺伝子の同時発現系のプロモーターに対する特異性

上記実施例ではプロモーターはSIVagmTY01の5' LTRプロモーターを使用していたが、RREを使用した2種遺伝子の同時発現系が、5' LTR以外の種々のプロモーターを使用した発現系に対しても適用しうるかを検討した。プロモーターとしては、他のヒトサイトメガロウイルス (CMV)由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター(EF1 α プロモーター)を使用した(図9下段)。

その結果、図9のグラフに示すように5' LTR以外のプロモーターを使用した場合においても、2種の遺伝子が同時に発現されうることが明らかとなった。また、RRE配列に依存した2種遺伝子の発現量制御も認められることが明らかとなった。従ってRREによる2種遺伝子の同時発現系は種々のプロモーターを用いた発現系において幅広く使用されうることが明らかとなった。

【0060】

〔実施例7〕 レポーター遺伝子の位置効果

レポーター遺伝子がRREの上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかによりそれぞれの遺伝子の発現量がどの程度異なるかを検討した。SIVagmジーントラン

スファアベクターでRRE6/s (6964-7993) 配列を含むベクターについて、ルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し(図10下段)、両ベクターにおける2種のレポーター遺伝子の発現量を比較した。

【0061】

その結果、図10のグラフに示すようにRREの上流に組み込まれるか下流に組み込まれるかでレポーター遺伝子の発現量に差は認められなかった。すなわちRRE配列を用いた2種遺伝子の同時発現系は、特に種々のレセプターや転写因子など1:1のモル比で複合体を形成する事で機能を有するタンパク質の発現に有用であることが明らかとなった。

【0062】

[共通の操作]

本実施例において、共通する操作を下記(1)から(7)に示した。

(1) 細胞の培養

ヒト胎児腎細胞由来細胞株293T細胞(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,vol.90,pp8392-8396,1993)は、10%非動化ウシ胎児血清を含むD-MEM(GibcoBRL)で培養した。また、細胞周期を停止させるためには、293T細胞をアフィジコリン処理(Calbiochem、最終濃度20 μ g/mlで48時間処理、G1-Sでの停止)、あるいはX線による照射(200 rad/分で20分照射後に48時間培養、G2-Mでの停止)のいずれかの処理を行なう。ヒト神経芽細胞株RBTM1とSH-SY5Y細胞(Cancer Research,vol.58,pp2158-2165,1998)は10%非動化ウシ胎児血清を含むRPMI1640(GibcoBRL)培地で培養する。神経細胞への分化誘導は全トランス型レチノイン酸処理(Sigma、最終濃度5 μ mol/mlで7日間培養)で行なう。培養はすべてプラスチックプレート(佐友ベークライト)で行なう。

【0063】

(2) ラット初代培養脳細胞培養の調製のための一般的な方法

ラット初代培養脳細胞は5%非動化ウシ胎児血清と5%非動化ウマ血清(Gibco BRL)を含むD-MEM(Gibco BRL)で培養する。初代細胞の調製は以下の方法で行なう。妊娠18日目のSDラットをジエチルエーテルによる深麻酔後に腋窩動脈放血を行い安楽死させる。死亡確認後に開腹を行い、胎児を含む子宮を摘出する。

子宮より無菌的に摘出した胎児の頭部より脳を摘出し作業液（50%D-MEM、50%P BS (Gibco BRL)、ペニシリン 5×10^4 U/L (Gibco BRL)、ストレプトマイシン50 mg/L (Gibco BRL) を含む）中に静置し、実体顕微鏡下で脳幹部分と大脳半球の髄膜を除去する。脳組織を作業液により1回洗浄した後手術用メスを用いて細切し、パパイン処理（パパイン (Worthington Biochem) 1.5 U/ ml、システイン(ナカライ) 0.2 mg/ ml、ウシ血清アルブミン(Sigma) 0.2 mg/ ml、グルコース（和光） 5 mg/ ml、DNase I(Gibco BRL) 0.1mg / mlを含む溶液中で転倒攪拌、32℃で30分間処理）後、ピペッティング操作により細胞を懸濁し、遠心操作（1200rpmで5分間）により細胞を回収する。回収した脳細胞は、5%非動化ウマ血清、5%非動化ウシ胎児血清、ペニシリン 5×10^4 U/L、ストレプトマイシン50mg/Lを含むD-MEMによる洗浄を2回行なう。洗浄後に細胞数を計測し、1ウェルあたり $1-3 \times 10^6$ 個の細胞密度でポリ-L-リジンコートした6ウェルプレート（セルタイトPL、住友ベークライト）にまき、炭酸ガスインキュベーター中（37℃、5% CO₂ 存在下）で培養する。

【0064】

（3） トランスフェクション

トランスフェクションはすべてLIPOFECTAMINEPLUS (Gibco BRL) を用いて添付説明書に従って行った。293T細胞を6ウェルのプラスチックプレート（住友ベークライト）へ1ウェルあたり 5×10^5 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中（37℃、10%炭酸ガス存在下）で48時間培養した。トランスフェクションの30分前に培養液を1ウェルあたり800 μ lのOptiMEM (Gibco BRL) に培地交換し培養を続けた。トランスフェクションに使用するDNA量は1ウェルあたり300ngのジーントランスファーベクターと、600ngのパッケージングベクターまたは空のベクターを使用した。DNAを100 μ lのOptiMEMに溶解後に6 μ lのPLUS reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌後15分室温で静置した。DNAとPLUS reagent (Gibco BRL) との混合液に、100 μ lのOptiMEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINEを添加して攪拌後さらに15分室温で静置した。以上の方法により調製したDNAとLIPOFECTAMINEとの複合体を含む溶液を6ウェルプレートで培養している293T細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中（37℃10%炭酸ガス存在

下) で3時間培養した。培養後1ウェルあたり1mlの20%非動化ウシ胎児血清を含むD-MEMを添加し、炭酸ガスインキュベーター中(37℃10%炭酸ガス存在下)で48時間培養した後にβ-ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイに使用した。

【0065】

(4) β-ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイ

β-ガラクトシダーゼアッセイとルシフェラーゼアッセイはそれぞれLuminescent beta-gal detection kit II(Clontech)とLuciferase Assay System(Promega)を用いて添付説明書に従って行った。サンプルとしてはDNAをトランスフェクションした293T細胞を1ウェルあたり800μlのReporter Lysis Bufferで溶解し、12000g、4℃で5分間遠心後に上清を分取したものを細胞溶解液として使用した。β-ガラクトシダーゼアッセイでは細胞溶解液20μlと基質液100μlを混合した後、室温で1時間静置後にルミノメーター(AutoLumat LB953,berthold)で10秒間発光強度を測定した。ルシフェラーゼアッセイでは細胞溶解液20μlと基質液100μlを混合後、すみやかにルミノメーター(AutoLumat LB953,berthold)で10秒間発光強度を測定した。すべてのアッセイで、それぞれサンプルについて3検体測定し平均値と標準偏差を求めた。

【0066】

(5) PCR

PCRはすべてPCR Supermix High Fidelity(Gibco BRL)を用いて行った。反応液90μlに、基質として1μgのテンプレートDNA、プライマーとして2種の合成オリゴヌクレオチドを最終濃度1nmol/mlになるように添加し、蒸留水で100μlになるように全容量を調整し、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9600、Perkin Elmer)を用いて反応を行った。サンプルを94℃で1分間反応後に、94℃ 30秒、55℃ 30秒、68℃ 90秒の反応を10サイクル行い、最後に68℃で5分間の反応を行った。反応液はWizard DNA Clean-up System(Promega)で精製した後に目的の制限酵素で切断し、1%低融点アガロースゲル(SeaPlaque GTG agarose、FMC Boichem、TAEバッファーに溶解)で分離後に目的のサイズのDNA断片をゲルより切り出しWizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)で精製し

た後にライゲーション反応に使用した。

【0067】

(6) SIVagmベクターによる遺伝子導入の一般的方法

標的となる293T細胞は6ウェルのプラスチックプレート(住友ベークライト)へ1ウェルあたり 5×10^5 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中(37℃、10%炭酸ガス存在下)で48時間培養後にアッセイに使用する。標的細胞にはベクターを含む溶液にポリブレン(Sigma)を最終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ になるように添加した溶液を重ねる事でベクターの導入を行なう。ベクター感染後48時間後に標的細胞をBeta-Gal Staining Kit(Invitrogen)を用いてX-galを基質とした染色を行い、倒立顕微鏡(DMIRB(SLR)、ライカ)で検鏡して標的細胞でのベクターガラクトシダーゼの発現を検出する。X-galにより青色に染色された細胞の数を定量し、293T細胞1細胞に対してベクターガラクトシダーゼを発現させるベクター量を1 Transducing Unit(TU)として算出する。

【0068】

(7) 抗体による遺伝子導入細胞の染色のための一般的な方法

ベクターを感染後48時間で、標的細胞をPBS(日研生物医学研究所)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(和光)を含むPBSにより室温で30分間固定する。固定後にPBSで5分間3回の洗浄を行い、その後2%正常ヤギ血清(Gibco BRL)を含むPBSで室温1時間のブロッキングを行なう。一次抗体としては、ラット脳細胞の分化ニューロンに対しては抗MAP-2モノクローナル抗体(マウスIgG、BOEHRINGER MANHEIM)を $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度に、 β -ガラクトシダーゼ導入細胞に対しては抗大腸菌 β -ガラクトシダーゼポリクローナル抗体(ウサギ、5 prime \rightarrow 3 prime, Inc.)を $8.2 \mu\text{g/ml}$ の濃度にそれぞれ2%正常ヤギ血清を含むPBSで希釈した溶液を使用し、37℃で30分間反応させる。一次抗体反応後、細胞をPBSで5分間3回洗浄した後に2次抗体との反応を行なう。2次抗体としてはEGFPを導入したラット脳細胞に対しては、Texas Redでラベルした抗マウスIgGポリクローナル抗体(ヤギ、EY LABORATORIES, INC.)を $10 \mu\text{g/ml}$ か、あるいはAlexa568でラベルした抗マウスIgGポリクローナル抗体(ヤギ、Molecular Probes, Inc.)を $4 \mu\text{g/ml}$ の濃度にそれぞれ2%正常ヤギ血清を含むPBSで希釈した溶液を使用する。ま

た、 β -ガラクトシダーゼ導入ラット脳細胞に対してはAlexa488でラベルした抗マウスIgGポリクローナル抗体（ヤギ、Molecular Probes, Inc.）とAlexa568でラベルした抗ウサギIgGポリクローナル抗体（ヤギ、Molecular Probes, Inc.）をそれぞれ4 μ g/mlの濃度に2%正常ヤギ血清を含むPBSで希釈した溶液を使用し、ラット脳細胞以外の β -ガラクトシダーゼ導入細胞に対してはAlexa568でラベルしたヤギ抗ウサギIgGポリクローナル抗体を4 μ g/mlの濃度に2%正常ヤギ血清を含むPBSで希釈した溶液を使用する。2次抗体との反応は、すべて37℃で30分間の条件で行なう。2次抗体反応後に標的細胞をPBSで5分間3回洗浄した後、PBSを重層して倒立顕微鏡（DMIRB(SLR)、ライカ）により蛍光を観察する事で目的のタンパク質の発現を検出する。

【0069】

【発明の効果】

本発明により、RRE配列の利用により2つの外来遺伝子を発現することができるベクターが提供された。本発明のベクターにおいては、RRE配列の改変により、2つの外来遺伝子の発現の量比を調整することが可能である。また、ウイルス由来の発現制御配列を他の発現制御配列に改変することにより、ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されている。パッケージングシグナルを有する最小限の領域をベクターに用いることにより、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険を減少させ安全性が高められている。本発明のベクターは、遺伝子治療などに好適に用いられる。

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dनावे Research INC.

<120> Vector for expressing two exogenous genes

<130> D3-008

<140>

<141>

<160> 76

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 1

gcagatctca accaggaggc gaggctgcat ttggg

36

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gcgaattcta cttactggtg ctgtaaagga gccaaa

36

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

atcggaattc ttttatigta agatggattg gtttttaa

40

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

cgggatccgc ggccgcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat

48

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcgagactag tgacttggtg agtaggctt

29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tcgaaagcct actcaccaag tcactactc

29

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 7

aatttctcga gcggccgca

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Oligonucleotide Sequence

<400> 8

aatttgcggc cgctcgaga

19

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc 40

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

gcgaattccc gtttgtgcta gggttcttag gcttct 36

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tccccgcgga tatggatctg tggagataga ggaacatatc

40

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gcgcggccgc ggatccgtcg acgcactttt taaaagaaaa ggga

44

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta 36

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

ggaattcccg cggtagttat taatagtaat caattacggg 40

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

cgggatccgc ggccgcttac ttgtacagct cgtccatgcc 40

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

atcggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaa

40

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

ataagaatgc ggccgctagc taagctgaat gaggagggtc aggcaactgt

50

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

gcgaattccc gtttgtgcta gggttcttag gcttct

36

<210> 20

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

agctagctag gctagcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat

48

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 22

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gcgaattcac tcaagtcct gttagggcgc cactgc

36

<210> 23

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

gcgaattcaa gcctactcac caagtctcct tcttgg

36

<210> 24

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

gcgaattcgc ccccatgtcg taccacccgc ctgccctact 40

<210> 25

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

ggaattcccg ggtcggacgg atccattaaa tgtttaattt ggtacttttt ctttccg 57

<210> 26

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

cggaattcac gcacacaaga ttgaacagac tttttaagcc 40

<210> 27

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 27

cggaattcac aacctctcat ggaggccgaa gcgctccatc

40

<210> 28

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 28

gcgaattccc caggcatttc cttgttggtg cgctggaaaa

40

<210> 29

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 29

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc

40

<210> 30

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

gcgaattctg cttcttcatt aatgatctct ttcactattt

40

<210> 31

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 31

cggaattctt tgacacactt ttgaagtcct agaataatcc

40

<210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

cggaattcgt ggggtgcatt cctaggccct tcaggatgac

40

<210> 33

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 33

cggaattctt ttccttgggt ccggacattg tctttgcata

40

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34

gcgaattcgc tcagcactaa ataggagaca attagaccaa

40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 35

gcgaattccc caggcatttc cttgttggtg cgctggaaaa

40

<210> 36

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 36

gcgaattcgc cccaatgcg tacccaccgc ctgccctact 40

<210> 37

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 37

gcgaattcgc cccagtcg tacccaccgc ctgccctact 40

<210> 38

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 38

gcgaattcgc cccactgcg tacccaccgc ctgccctact 40

<210> 39

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 39

gcgaattcgc cccctttgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 40

gcgaattcgc ccccgttgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 41

gcgaattcgc ccccttgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 42

gcgaattcgc cccaattgcg taccaccgc ctgccctact

40

<210> 43

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 43

gcgaattcgc cccgattgcg tacccaccgc ctgccctact

40

<210> 44

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 44

gcgaattcgc ccctattgcg tacccaccgc ctgccctact

40

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 45

tatataagca gagctcgctg gcttgtaact cagtctctt

39

<210> 46

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 46

tatataagtg cagtagctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 47

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 47

tataaaaagc gaagccgctg gcttgtaact cagtctctta

40

<210> 48

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 48

gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc 40

<210> 49

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 49

cggggtacct caatattggc cattagccat attattcatt 40

<210> 50

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 50

agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac 40

<210> 51

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 51

gcggtaccta gttattaata gtaatcaatt acggg

35

<210> 52

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 52

agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac

40

<210> 53

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 53

gcggtaccag gctccccagc aggcagaagt atgca

35

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 54

agttacaagc cagcgtactg cacttatata cggttctccc

40

<210> 55

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 55

ggggtaccat tgattattga ctagttatta atagtaatca

40

<210> 56

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 56

agttacaagc cagcggcttc gctttttata gggccgccgc 40

<210> 57

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 57

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggac gctggcttgt aactcagtct cttactagg 99

<210> 58

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 58

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta

36

<210> 59

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 59

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggat caatattggc cattagccat attattcat 99

<210> 60

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 60

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaaag aaaagggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggaa ggctccccag caggcagaag tatgcaaag 99

<210> 61

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 61

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaaag aaaagggagg actggatggg atttattact 60
ccgataggac attgattatt gactagttat taatagtaa 99

<210> 62

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 62

gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc tttcta 36

<210> 63

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 63

atcggaattc gccgccatgg aagacgcaa aaacataaag aaaggc 46

<210> 64

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 64

atcggaattc ttacacggcg atctttccgc ctttcttggc 40

<210> 65

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 65

atcggaattc gccgccatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcacc

46

<210> 66

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 66

atcggaattc ttacttgtac agctcgtcca tgccgagagt

40

<210> 67

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 67

gcggtacctg gatgggattt attactccga tagga

35

<210> 68

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 68

gcgaattcgc ccccgctgcg tacccaccgc ctgccc

36

<210> 69

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 69

atcggaattc ttttattgta agatggattg gtttttaa

40

<210> 70

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 70

gcgaattccc gtttgtgcta gggttcttag gcttct

36

<210> 71

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 71

gctctagacc cccaggagtt tagtcgtgcc tgatcctcta

40

<210> 72

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 72

agctagctag gctagcggat atggatctgt ggagatagag gaacatat 48

<210> 73

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 73

ataagaatgc ggccgctagc taagctgaat gaggagggtc aggcaactgt 50

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 74

gcggtacctg gatgggatit attactccga tagga 35

<210> 75

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 75

gcgaattctg cttcttcatt aatgatctct ttcactattt 40

<210> 76

<211> 9170

<212> DNA

<213> Simian immunodeficiency virus

<400> 76

cagtctctta ctaggagacc agcttgagcc tgggtgttcg ctggttagcc taacctggtt	60
ggccaccagg ggtaaggact ccttggctta gaaagctaataaacttgcct gcattagagc	120
ttatctgagt caagtgccct cattgacgcc tcactctctt gaacgggaat cttccttact	180
gggttctctc tctgaccag gcgagagaaa ctccagcagt ggcgcccgaa cagggacttg	240
agtgagagt taggcacgta cagctgagaa ggcgtcggac gcgaaggaag cgcggggtgc	300
gacgcgacca agaaggagac ttggtgagta ggcttctcga gtgccgggaa aaagctcgag	360
cctagttaga ggactaggag aggccgtagc cgtaactact ctgggcaagt agggcaggcg	420
gtgggtacgc aatgggggcg gctacctcag cactaaatag gagacaatta gaccaatttg	480
agaaaatacg acttcgcccg aacggaaaga aaaagtacca aattaaacat ttaatatggg	540
caggcaagga gatggagcgc ttcggcctcc atgagagggt gttggagaca gaggagggt	600

gtaaaagaat catagaagtc ctctaccccc tagaaccaac aggatcggag ggcttaaaaa	660
gtctgttcaa tcttgtgtgc gtactatatt gcttgcacaa ggaacagaaa gtgaaagaca	720
cagaggaagc agtagcaaca gtaagacaac actgccatct agtggaaaaa gaaaaaagtg	780
caacagagac atctagtggc caaaagaaaa atgacaaggg aatagcagcg ccacctgggt	840
gcagtcagaa ttttccagcg caacaacaag gaaatgcctg ggtacatgta cccttgtcac	900
cgcgcacctt aaatgcgtgg gtaaaagcag tagaggagaa aaaatttgga gcagaaatag	960
tacctatgtt tcaagcccta tcagaaggct gcacacccta tgacattaat cagatgccta	1020
atgtgctagg agatcatcaa ggggcattac aaatagtga agagatcatt aatgaagaag	1080
cagcccagtg ggatgtaaca caccactac ccgcaggacc cctaccagca ggacagctca	1140
gggaccctcg cggctcagat atagcagggc ccaccagctc agtacaagaa cagttagaat	1200
ggatctatac tgctaacccc cgggtagatg taggtgccat ctaccggaga tggattattc	1260
taggacttca aaagtgtgtc aaaatgtaca acccagtatc agtcctagac attaggcagg	1320
gacctaaaga gcccttcaag gattatgtgg acagatttta caaggcaatt agagcagaac	1380
aagcctcagg ggaagtgaac caatggatga cagaatcatt actcattcaa aatgctaadc	1440
cagattgtaa ggtcatcctg aagggcctag gaatgcaccc cacccttgaa gaaatgttaa	1500
cggcttgtca gggggtagga ggcccaagct acaaagcaaa agtaatggca gaaatgatgc	1560
agaccatgca aaatcaaaac atggtgcagc agggaggctc aaaaagacaa agacccccac	1620
taagatgtta taattgtgga aaatttggcc atatgcaaag acaatgtccg gaaccaagga	1680
aaacaaaatg tctaaagtgt ggaaaattgg gacacctagc aaaagactgc aggggacagg	1740
tgaatttttt agggtagtga cggtaggatg gggcaaaacc gagaaatttt cccgccgcta	1800
ctcttggagc ggaaccgagt gcgcctcctc caccgagcgg caccacccca tacgaccag	1860
caaagaagct cctgcagcaa tatgcagaga aagggaacaa actgaggagg caaaagagga	1920
atccaccggc aatgaatccg gattggaccg agggatattc tttgaactcc ctctttggag	1980
aagaccaata aagacagtgt atatagaagg ggtccccatt aaggcactgc tagacacagg	2040
ggcagatgac accataatta aagaaaatga tttaacatta tcaggtccat ggagacccaa	2100
aattataggg ggcataggag gaggccttaa tgtaaaagaa tataacgaca gggaagtaaa	2160
aatagaagat aaaattttga gaggaacaat attgttagga gcaactccca ttaatatat	2220
aggtagaaat ttgctggccc cggcagtgcc ccggttagta atgggacaat tatcagaaaa	2280
aattcctgtc acacctgtca aattgaagga aggggctcgg ggaccctgtg taagacaatg	2340

gcctctctct aaagagaaga ttgaagcttt acaggaaata tgttcccaat tagagcagga	2400
aggaaaaatc agtagagtag gaggagaaaa tgcatacaat accccaatat tttgcataaa	2460
gaagaaggac aaatcccagt ggaggatgct agtagacttt agagagttaa ataaggcaac	2520
ccaagatttc tttgaagtgc aattagggat accccaccca gcaggattaa gaaagatgag	2580
acagataaca gttttagatg taggagacgc ctattattcc ataccattgg atccaaattt	2640
taggaaatat actgctttta ctattcctac agtgaataat cagggacccg ggattaggt	2700
tcaattcaac tgtctccgc aagggtggaa aggatctctt acaatcttcc aaaatacagc	2760
agcatccatt ttggaggaga taaaaagaaa ctigccagca ctaaccattg tacaatacat	2820
ggatgattta tgggtaggtt ctcaagaaaa tgaacacacc catgacaaat tagtagaaca	2880
gttaagaaca aaattacaag cctggggctt agaaacccca gaaaagaaga tgcaaaaaga	2940
accaccttat gagtggatgg gatacaaaact ttggcctcac aaatgggaac taagcagaat	3000
acaactggag gaaaaagatg aatggactgt caatgacatc cagaagttag ttgggaaact	3060
aaattgggca gcacaattgt atccaggtct taagacaaga atatgcaagt taattacagg	3120
aggaaagaaa aatctgttag agctagtagc ttggacacct gaggcagaag ctgaatatgc	3180
agaaaatgca gagattctta aaacagaaca ggaaggaacc tattacaaac caggaatacc	3240
tattagggca gcagtacaga aattggaagg aggacagtgg agttaccaat tcaacaaga	3300
aggacaagtc ttgaaagtag gaaaatacac caagcaaaag aacaccata caaatgaact	3360
tcgcacatta gctggtttag tgcagaagat ttgcaaagaa gctctagtta tttgggggat	3420
attaccagtt ctagaactcc cgatagaaag agaggatatg gagcaatggt gggcggatta	3480
ctggcaggta agctggattc ccgaatggga tttgtcagc accccacctt tgctcaaact	3540
atggtacaca ttaacaaaag aaccataacc caaggaggac gtttactatg taggagcatg	3600
caacagaaat tcaaaagaag gaaaagcagg atacatctca caatacgga aacagagagt	3660
agaaacatta gaaaacacta ccaatcagca agcaaaatta acagctataa aaatggcttt	3720
ggaagacagt gggcctaagt tgaacatagt aacagactct caatatgcaa tgggaatfff	3780
gacagcacia cccacacaaa gtgattcacc attagtagag caaattatag ccttaatgat	3840
acaaaagcaa caaatatatt tgcagtgggt accagcacat aaaggaatag gaggaatga	3900
ggagatagat aaattagtga gttaaaggcat tagaagagtt ttattcttag aaaaaataga	3960
agaagctcaa gaaaagcatg aaagatatca taataattgg aaaaacctag cagatacata	4020
tgggcttcca caaatagtag caaaagagat agtggccatg tgtccaaaat gtcaaataaa	4080

gggagaacca	gtgcatggac	aagtggaatgc	ctcacctgga	acatggcaga	tggattgtac	4140
tcatctagaa	aaaaaagtag	tcatagtgtc	gggccatgta	gccagtgga	tcatagaagc	4200
agaagtcata	cctagggaaa	caggaaaaga	aacggcaaag	tttctattaa	aaatactgag	4260
tagatggcct	ataacacagt	tacacacaga	caatgggcct	aactttacct	cccaagaagt	4320
ggcagcaata	tgttgggtggg	gaaaaattga	acatacaaca	ggtataccat	ataaccccc	4380
atctcaagga	tcaatagaaa	gcatgaacaa	gcaattaaaa	gagataattg	ggaaaataag	4440
agatgatigc	caatatacag	aggcagcagt	actgatggct	tgcatacttc	acaattttaa	4500
aagaaagggg	ggaatagggg	gacagacttc	agcagagaga	ctaattaata	taataacaac	4560
acaattagaa	atacaacatt	tacaaaccaa	aattcaaaaa	attttaaatt	ttagagtcta	4620
ctacagagaa	gggagagacc	ctgtgtggaa	aggaccggca	caattaatct	ggaaagggga	4680
aggagcagt	gtcctcaagg	acggaagtga	cctaaagggt	gtaccaagaa	ggaaagctaa	4740
aattattaag	gattatgaac	caaacaaaag	agtgggtaat	gagggtgacg	tggaaggtac	4800
caggggatct	gataactaaa	tggcagggaa	tagtcagata	ttggatgaga	caaagaaatt	4860
tgaaatggaa	ctattatatg	cattacaaaa	ttacatgggc	ttggtacacc	atgagtagat	4920
atgtaatacc	aataggaaaa	catggggaaa	tatgtgtaga	cctatatagg	catttaacac	4980
cagagcaagg	atggctatcc	acatatgcag	taggtataca	atatgtaagc	aatttagaat	5040
ctaaatatag	aacagaatta	gaccctgcta	cagcagatag	tataatacat	ggtcactatt	5100
ttaattgttt	taaagaaaga	gccatccaac	aagctctgag	gggccacaga	tttgtcttct	5160
gtcagtttcc	agaagggcat	aaaagcacag	gacaggtacc	atctttgcag	tacctagctc	5220
tgctcgcaca	tcaaaatggc	ctcaggggaga	gatccaagag	aggcaagacc	aggagaagta	5280
gaaatttggg	atctaagcag	ggagccgtgg	gacaaatggc	taagagatat	gttacaagat	5340
ctcaaccagg	aggcgaggct	gcattttggg	agagaactcc	tgttccaagt	atggaactac	5400
tgtcaggagg	aaggagaaag	acatggtact	cccatgatgg	aaagggccta	caaatattat	5460
aggctagtac	aaaaggctct	ctttgtgcat	tttcgatgtg	ggtgcaggag	aaggcagccc	5520
tttgaaccat	acgaggagag	gagagatgga	caagggggag	gcagagcaaa	tcgtgtccca	5580
ccaggacttg	agtgaagact	atcagaagcc	tctgcagact	tgtaaaaata	aatgtttttg	5640
caaaaaatgt	tgttaccact	gtcagctttg	ctttctgcaa	aaaggcctag	gtgttaccta	5700
tcatgccctt	aggaccagaa	gaaagaagat	tcgttcgctt	aatttggctc	ctttacagca	5760
ccagtaagta	tgagggtatac	aataataacc	ttaggaataa	tagtgatagg	aatagggata	5820

gtgttaagta agcaatggat aacagtcctt tatggaatac cagtatggaa aaacagctcg	5880
gtgcaggctt tctgcatgac tcccaccaca agcttatggg ctactactaa ttgcatacca	5940
gatgatcatg actatacaga agtacctcta aatatcactg aaccatttga ggcatggggt	6000
gatagaaacc cattaatagc acaagcagcc agtaacatcc atttactctt tgagcaaaact	6060
atgaaacctt gtgtgaagtt atcaccacta tgcatacaaga tgaattgtgt agagttaa	6120
tccacaagag aaagggcgac aacacctaca acgacgccga aatctaccgg cctaccctgt	6180
gtaggcccga cgtcagggtga aaatctacag tctgtaatg caagcattat agaaagggtg	6240
atggaggatg agcccgccctc taattgtaca ttcgcaatgg ctggctatgt aagagatcag	6300
aagaaaaatt attattctgt ggtgtggaat gatgcagaaa tctattgcaa aaataagact	6360
aatagcacta gcaaagagtg ttacatgatt cattgtaatg actcagttat aaaagaagca	6420
tgtgacaaaa catattggga tcagttgagg ttaaggtatt gtgctccagc aggttatgct	6480
ttgctaaaaat gtaatgatga agattataat ggtataaac aaaattgctc aaatgtatca	6540
gtagtgcatg gtacaggctt aatgaataca acagtgacaa cagggttggt gctgaatgga	6600
agctatcatg agaatcgaac ccagatatgg cagaaacata gggtaaataa taacacagta	6660
ttgatcttgt tcaacaagca ctataatcta tcagtcacct gtaggagacc aggaaacaag	6720
acagtcctac cggtaacgat aatggcggtg ctggttttcc actctcaaaa atacaacatg	6780
aagcttagac aggcttggtg tcacttcgaa ggcaattgga gaggtgcctg gcgggaagta	6840
aaacaaaaaa tagtagagtt accaaaagac aggtataaag gaaccaataa tacagaacac	6900
atatacctgc aaagacaatg gggagaccca gaagcatcca acttgttggt taattgtcaa	6960
ggagaattct tttattgtaa gatggattgg tttttaaatt acttaataa taaaacatgg	7020
gatgcatacc ataatttttg tagcagcaaa aagaaaggac acgcaccagg accatgtgta	7080
caaaggacgt atgttgctta ccataatcagg tctgtaataa atgattccta taccctatca	7140
aagaaaactt atgctccgcc aagagaagga catttgcaat gcaggtccac agtcactggg	7200
atgacagttg agcttaatta taatagtaaa aacagaacca acgtgacact aagtccccag	7260
atagaatcta tctgggcggc tgaattgggc agatacaaat tagtggaat cacaccaatt	7320
ggctttgcac ccacagaagt aaggcgttat acgggaggac atgagaggca aaagagagtc	7380
ccgtttgtgc tagggttctt aggccttctg ggggctgctg gaactgcaat gggagcagcg	7440
gcgagcagcc tgacggtcca gtcccggcat ttgcttgctg ggatactgca gcagcagaag	7500
aatctgctgg cggctgtgga ggctcaacag cagatgttga agctgaccat ttgggggtgtt	7560

aaaaacctca atgcccgcgt cacagccctt gagaagtacc tagaggatca ggcacgacta	7620
aactcctggg ggtgcgcatg gaaacaagta tgcatacca cagtggagt ggcctggaca	7680
aatcggactc cggattggca aaatatgact tggttggagt gggaaagaca aatagctgat	7740
ttggaaagca acattacggg acaattagtg aaggctagag aacaggagga aaagaatcta	7800
gatgcctatc agaagttaac tagttgggtca gatttctggt ctgggttcga tttctcaaaa	7860
tggcttaaca ttttaaaaaat gggattttta gtaatagtag gaataatagg gttaagatta	7920
ctttacacag tatatggatg tatagtgagg gttaggcagg gatatgttcc tctatctcca	7980
cagatccata tccaccaagt ggggaaggga cggccagaca acgccgacga gccaggagaa	8040
ggtggagaca acagcaggat caaattagag tcttggtaga aagactccaa gagcagggtgt	8100
atgcagtiga ccgcctggct gacgaggctc aacacttggc tatacaacag ttgcctgacc	8160
ctcctcattc agcttaggaa agcttttcaa tacctgcaat atgggctcgc agaactcaaa	8220
accggcgcac aagaaatact ccaaactctg gcaggcggtg cacaaaacgc atgtcaccag	8280
atatggcttg cttgcagatc cgcttatagg aacatcgtca acagtccaag aagagtgcga	8340
caaggccttg aggaaatcct taattaggaa acaaaatggc aacatgacgg aagaggaaag	8400
gaggcttcaa gaaggagaca cctgggaaga gtggtcggat gatgaggaag aagtgggatt	8460
tccagtgaga ccaagagtac ccttaaggca aatgacttat aaacttgcag tggatttttc	8520
gcacttttta aaagaaaagg gaggactgga tgggatttat tactccgata ggagaaataa	8580
gatcctgaat ctgtatgctc ttaatgaatg ggggataatt gatgattgga atgcctggtc	8640
gaagggacca ggaataagat tccctaaatg ctttgggttc tgctttaagc tagtgccagt	8700
ggacttacat gaggaagcac aaacatgtga aagacattgc ctagtccatc cagcgcagat	8760
gggagaagat ccagatggta tcagccatgg agagatcttg gtgtggaagt ttgatcctat	8820
gttggcaata cagtacgacc ccaatcggga gtactttact gacatgcatg ggctggtgaa	8880
gaggaagtag ccagaccgca agcctgcggt tagaacaatca ccatggagat gacattaaaa	8940
actgctgacg ggactttcca gcgaagggaac tttccaaggc gggacatggg cggctccgggg	9000
agtggcttta cctcagagc tgcataaaag cagatgctcg ctggcttgta actcagtctc	9060
ttactaggag accagcttga gcctgggtgt tcgctggtta gcctaacctg gttggccacc	9120
aggggtaagg actccttggc ttagaaagct aataaacttg cctgcattag	9170

【図面の簡単な説明】

【図 1】

サル免疫不全ウイルスクローン SIVagmTY01を用いたレンチウイルスベクターシステムの概要を示す図である。

【図 2】

5' LTRのプロモーター配列であるU3領域を他のプロモーター配列に置換したSIVagmジーントランスファーベクターの構造図である。

【図 3】

SIVagmジーントランスファーベクターの3' LTRのU3領域を他のプロモーター配列へ置換したベクターの構造と、それが標的細胞で逆転写された結果生じると予想される、5' LTRのU3プロモーター領域の構造を示した図である。

【図 4】

ジーントランスファーベクターのパッケージングシグナルの同定方法の概念図である。

【図 5】

ジーントランスファーベクターのgagタンパク質の翻訳開始コドンに対する点突然変異体を用いたパッケージングシグナルの同定方法の概念図である。

【図 6】

RREによる 2 遺伝子同時発現ベクターの構造図である。RREの上流と下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子と β -ガラクトシダーゼ遺伝子が組み込まれ、更にルシフェラーゼ遺伝子の上流にスプライシングドナー配列を、RRE配列の下流にスプライシングアクセプター配列がそれぞれ組み込まれている。ベクターからはスプライシングの有無により 2 種の mRNA が産生される。

【図 7】

さまざまなRRE配列を有するベクターの構造図である。

【図 8】

プロモーターに5' LTRを持ち、さまざまなRRE配列を有するベクターより発現される 2 種の遺伝子の発現量を測定した結果を示す。

【図 9】

グラフは、5' LTR以外の種々のプロモーターを用いて構築した2遺伝子同時発現系における遺伝子発現を示す。プロモーターとしては、ヒトサイトメガロウイルス (CMV)由来のプロモーター、あるいは哺乳類細胞由来のプロモーター(EF1 α プロモーター)を使用した。下段にベクターの構造図を示した。

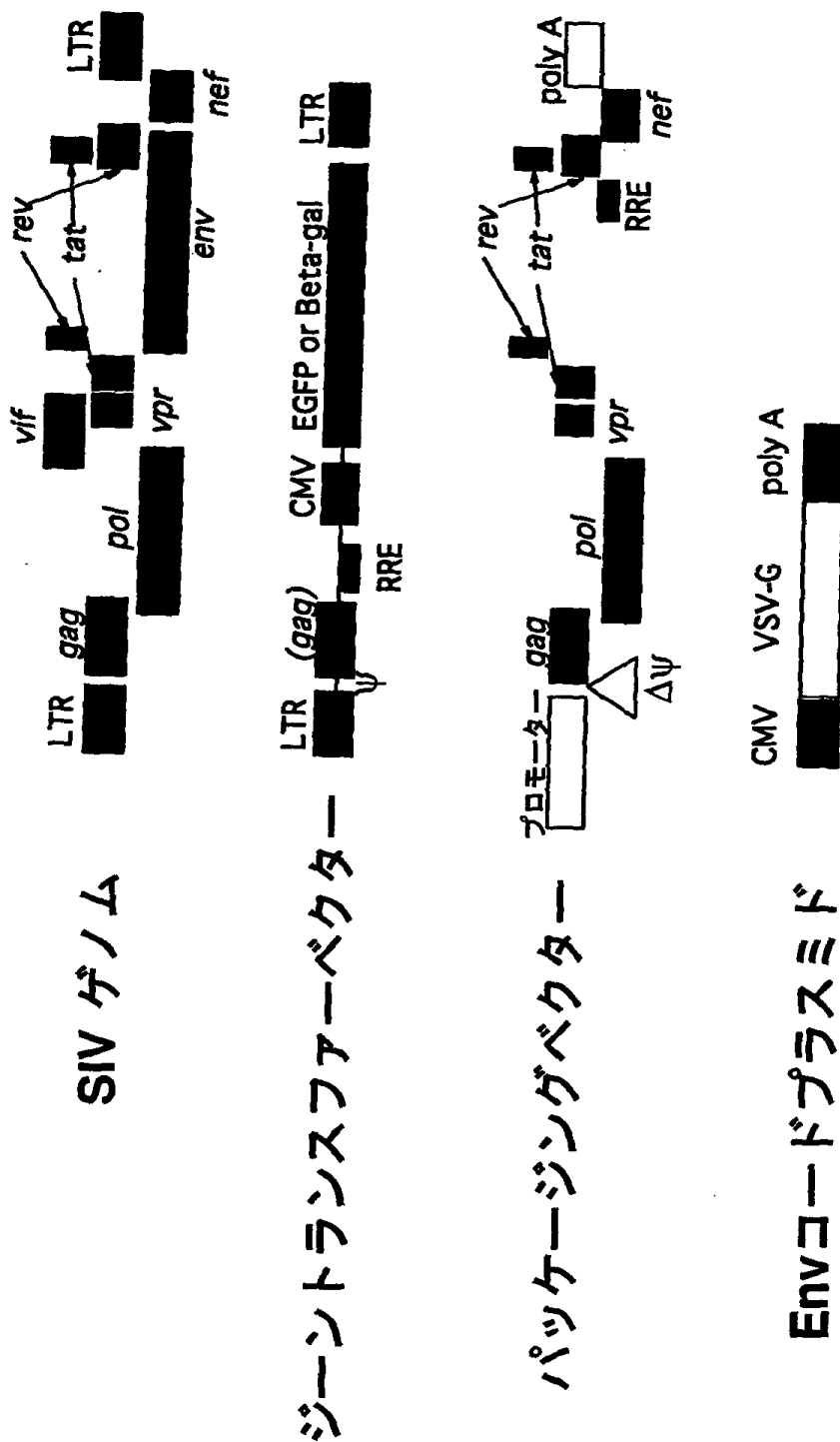
【図 1 0】

SIVagmジーントランスファーベクターでRRE6/s (6964-7993) 配列を含む2遺伝子同時発現ベクターについて、ルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼの位置を相互に置換したベクターを作製し(下段)、両ベクターにおける2種のレポーター遺伝子の発現量を比較した結果を示す(グラフ)。

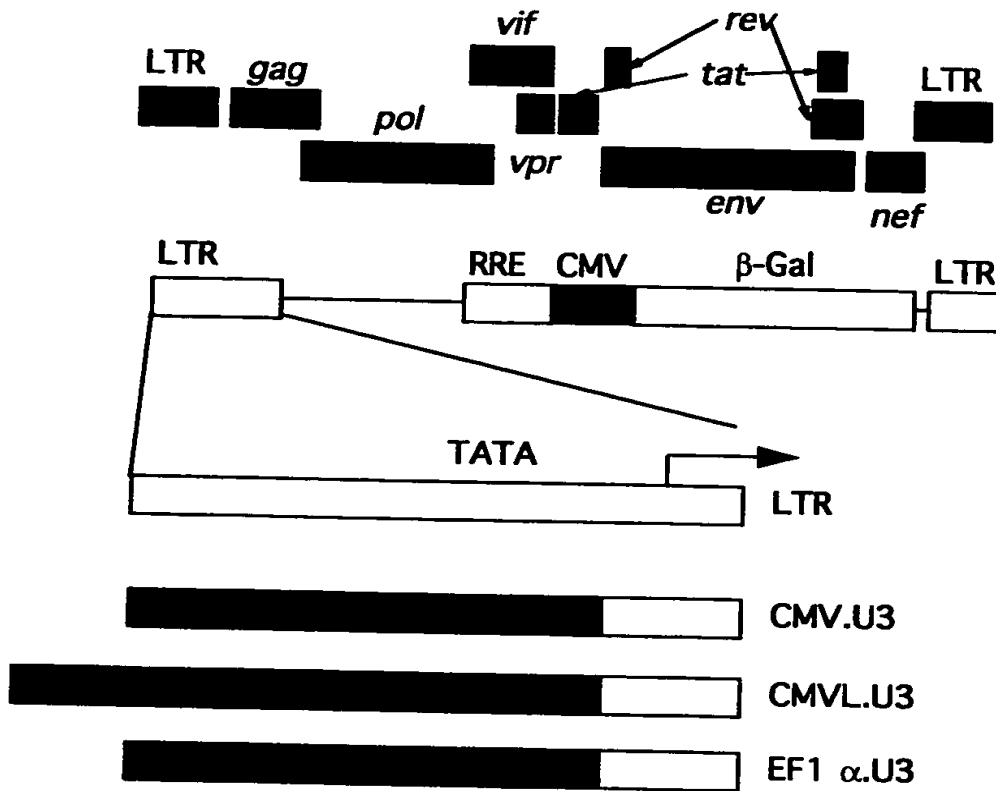
【書類名】

図面

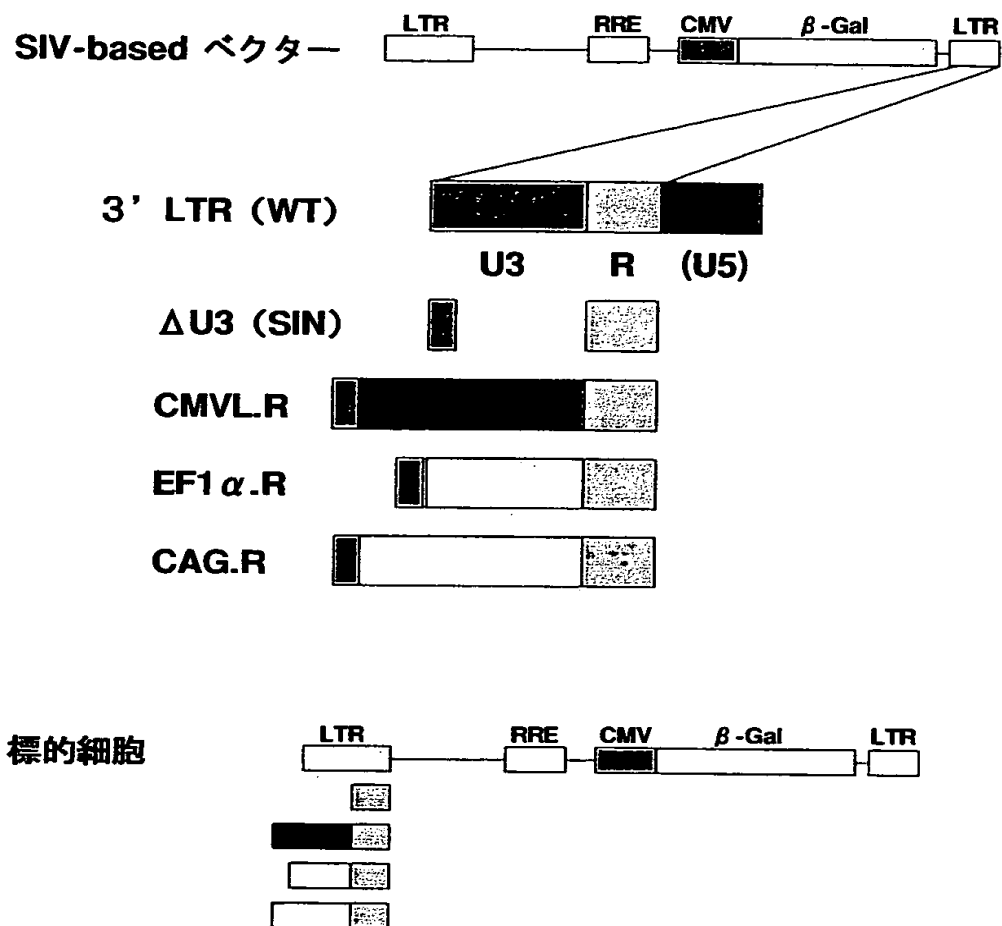
【図1】



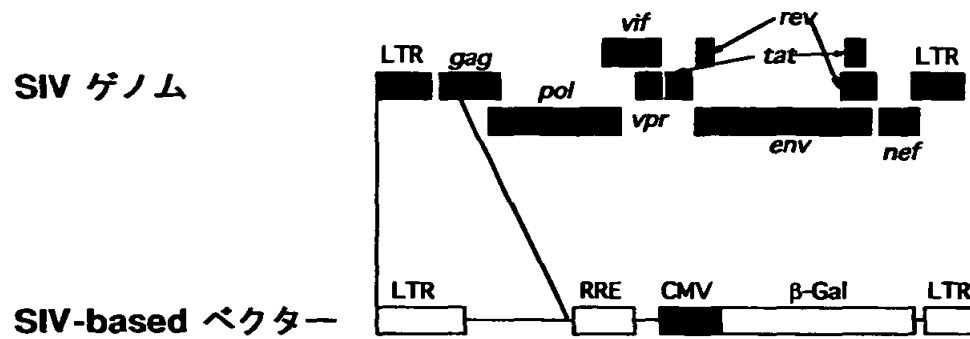
【図 2】



【図 3】



【図 4】

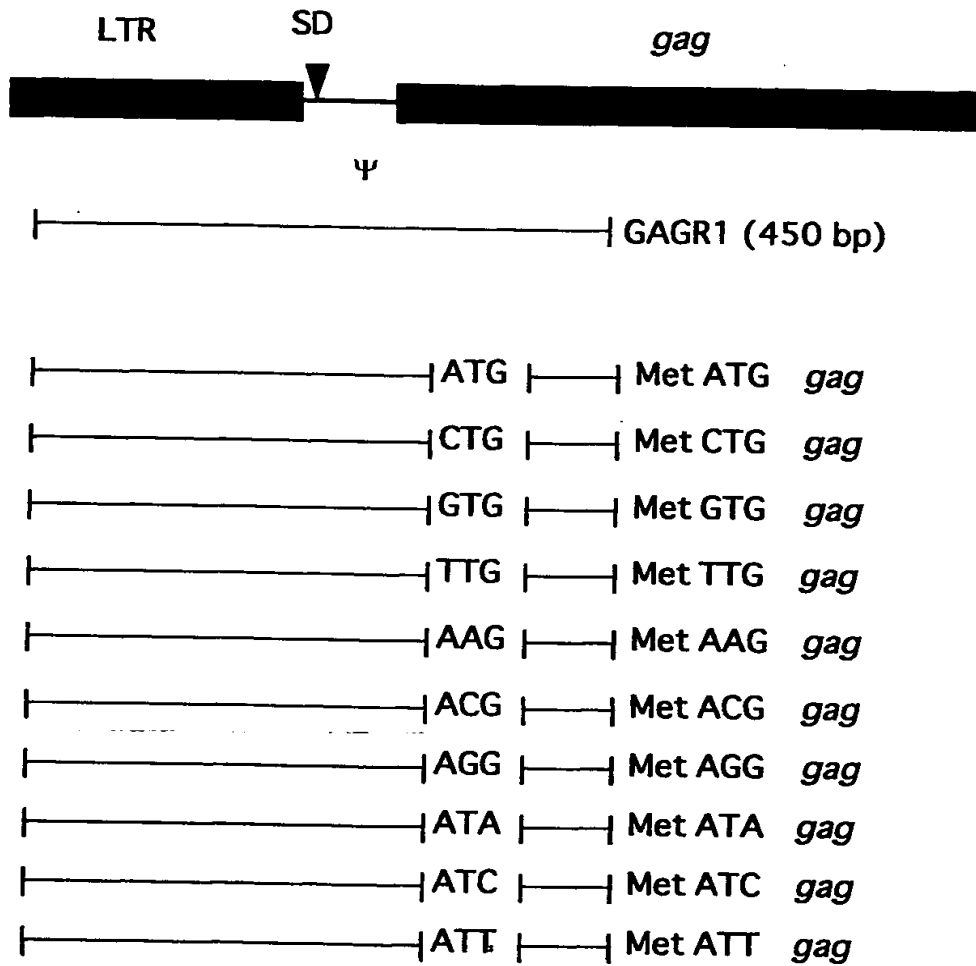


種々の長さのLTR-*gag*領域のDNA断片を含むベクター

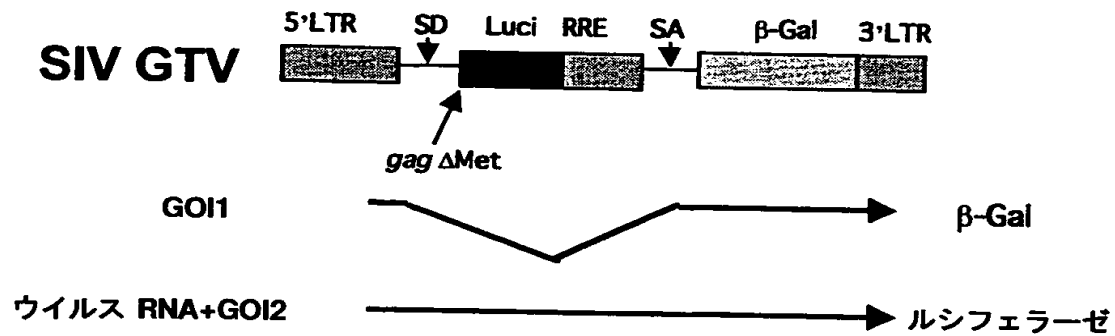


β-ガラクトシダーゼアッセイでパッケージングを検討

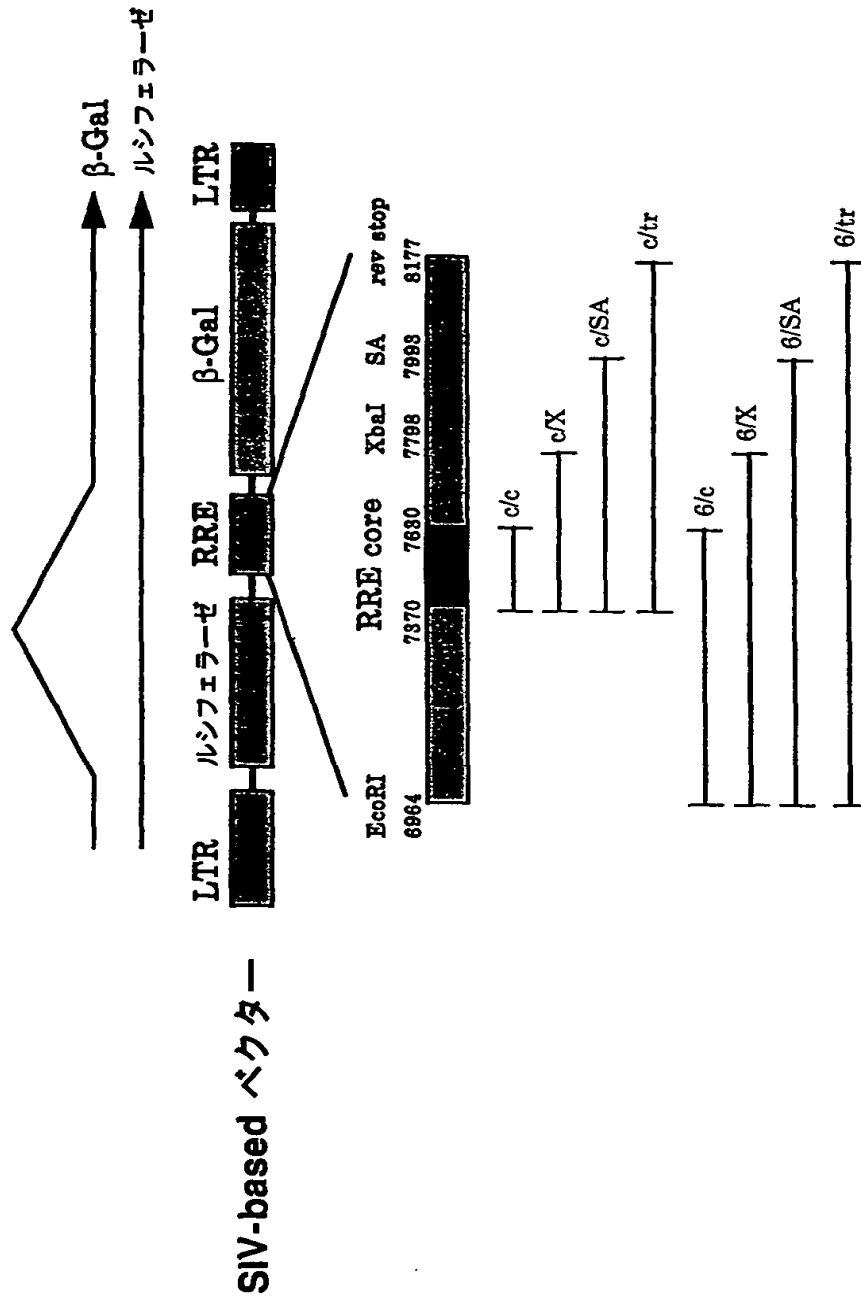
【図 5】



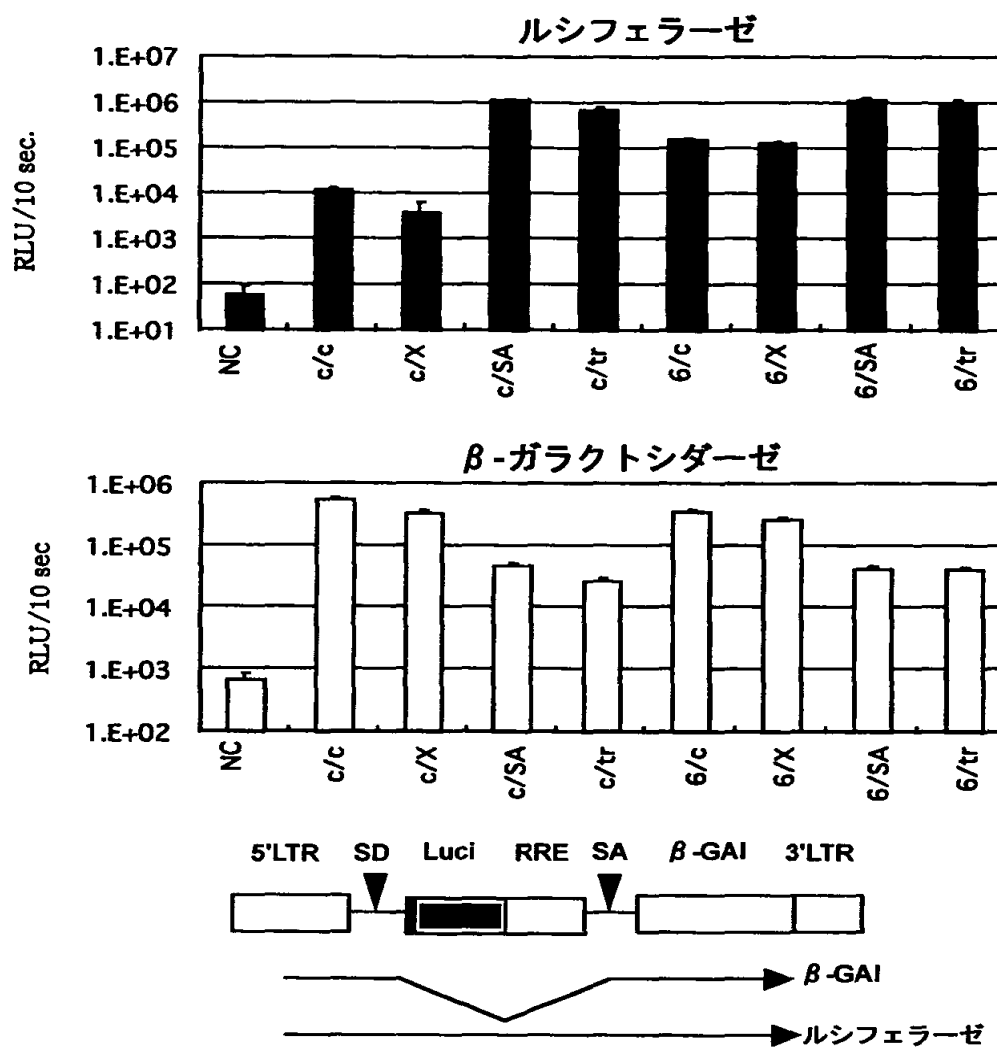
【図 6】



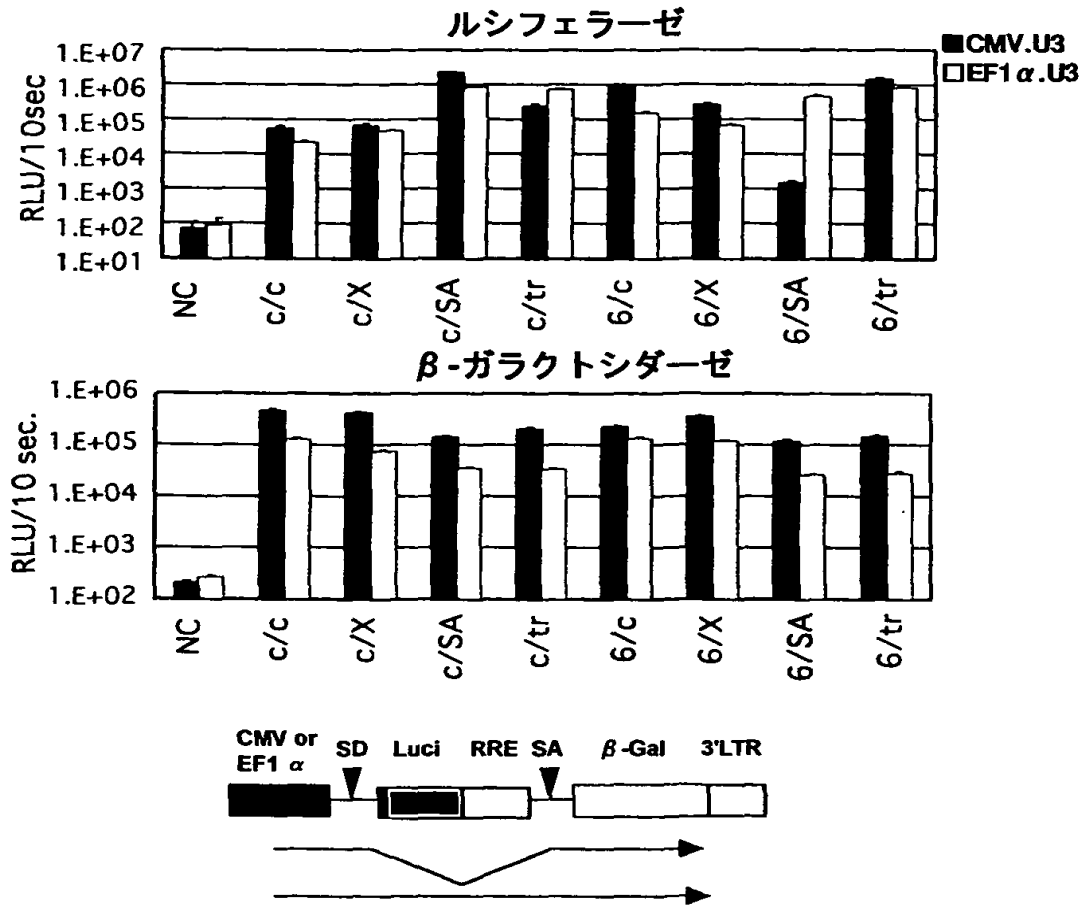
【図 7】



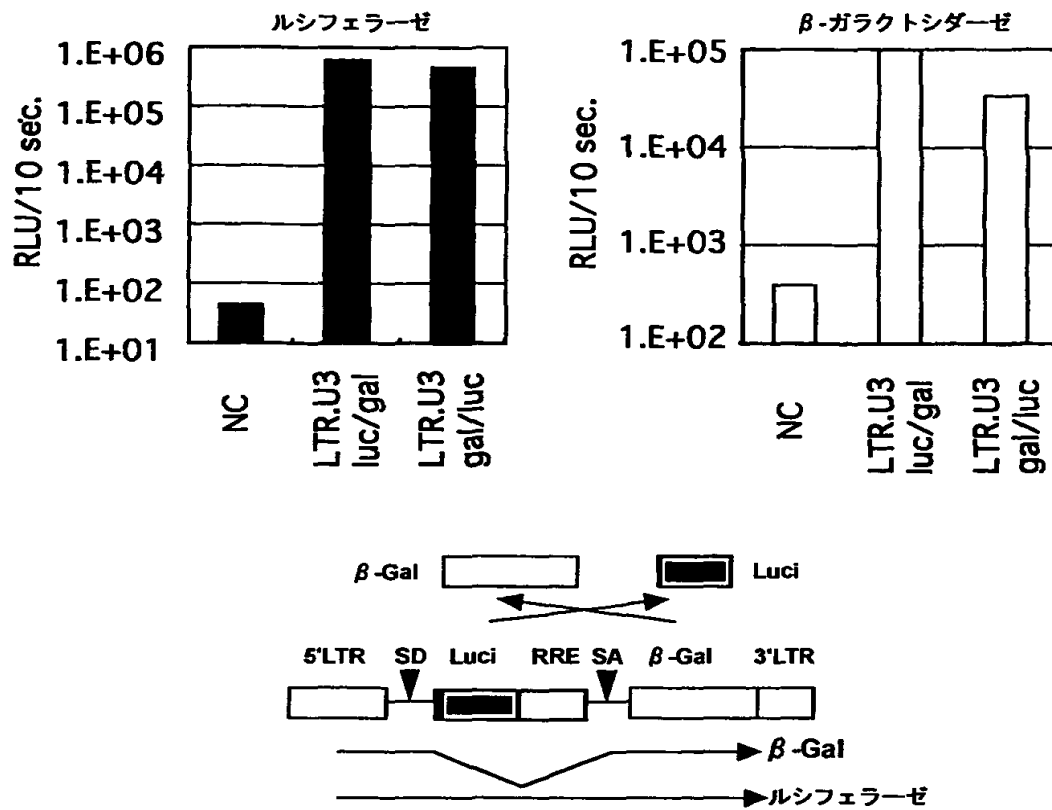
【図 8】



【図9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 2つの外来遺伝子を同時に発現することができるベクターを提供することを課題とする。

【解決手段】 RRE配列の利用により2つの外来遺伝子を発現することができ、その改変により該2つの外来遺伝子の発現の量比を調製することが可能なベクターが提供された。該ベクターはSIVをベースとしたレンチウイルスベクターとすることができ、ウイルス由来の発現制御配列が他の発現制御配列に改変され、該ウイルス由来のタンパク質に対する依存性が解消されるように構築された。このベクターは、パッケージングシグナルを有するが、遺伝子組換えによる野生株の出現の危険が減少するように改変され、さらにウイルス構造タンパク質が発現しないように改変されている。このベクターは、2種の遺伝子を、発現量や発現量比を制御して導入することが必要な遺伝子治療用ベクターとして極めて有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 5 1 5 5 1 0 7]

1. 変更年月日 1 9 9 5 年 1 1 月 1 日
[変更理由] 新規登録
住 所 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号
氏 名 株式会社ダイナベック研究所

